

Université de Montréal

Étude de la physiopathologie des souris déficientes
en 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL) :
un modèle de la déficience humaine en HL

Par

Nicolas Gauthier

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade maîtrise ès sciences (M.Sc.) en Biochimie

Décembre 2006

© Nicolas Gauthier, 2006



W)

4

U58

2007

V. 084

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Étude de la physiopathologie des souris déficientes en
3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL) :
un modèle de la déficience humaine en HL

Présenté par :
Nicolas Gauthier

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Edgard Delvin
Président rapporteur

Dr. Grant A. Mitchell
Directeur de recherche

Dre. Blandine Comte
Membre du jury

RÉSUMÉ

Notre laboratoire a généré une souris déficiente en HMG-CoA Lyase (HL) par invalidation génique conditionnelle hépatospécifique. Le modèle développe des symptômes semblables à son homologue humain (crises hypoglycémiques, léthargie, stéatose hépatique et patron caractéristique d'acides organiques urinaires). Un changement de diète a permis d'éviter les crises qui entraînaient la mort vers 3 semaines, et d'augmenter la survie jusqu'à ≥ 7 mois. L'invalidation efficace du gène d'HL a été documentée dans les hépatocytes. Il n'y a ni la présence ou l'activité détectable d'HL, ni d'activité cétogénique dans le foie déficient en HL. Les études métaboliques y compris par résonance magnétique nucléaire ont démontré un métabolisme énergétique anormal particulièrement au niveau du cycle de Krebs dont le flux est diminué dans le foie des souris déficientes en HL. Le dosage des acyls-CoA hépatiques par spectrométrie de masse a révélé une accumulation anormale chez les souris atteintes. Le modèle reproduit les signes cliniques et biochimiques des patients humains et servira de base pour des études thérapeutiques.

Mots-Clés

Leucine, corps cétoniques, stéatose hépatique, génétique biochimique, syndrome de Reye, métabolisme énergétique, Coenzyme A, céto-genèse

ABSTRACT

In humans, the hereditary deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG) CoA lyase (HL), the last enzyme of ketogenesis, causes hypoglycaemia and coma. We created a HL-deficient (HL^{-/-}) mouse by organospecific gene targeting using the Cre-Lox technique.

HL^{-/-} mice are viable but die at about 28 days in acute crisis with hypoglycaemia, coma, fatty liver and a urinary organic acid pattern characteristic of HL deficiency. By dietary manipulation, we increased survival to up to 7 months. HL gene targeting appears complete in hepatocytes. There is no detectable HL peptide or activity and ketogenesis is undetectable. Mass spectrometric and magnetic resonance studies of HL^{-/-} liver show increased HMG-related acyl-Coenzyme A levels and striking abnormalities of energy metabolism in the Krebs cycle.

Keywords

Ketone bodies, Ketogenesis, Inborn error of metabolism, Reye-like syndrome, leucine catabolism, Coenzyme A, hepatic steatosis

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-------------|
| RÉSUMÉ | III |
| ABSTRACT | IV |
| TABLE DES MATIÈRES | V |
| LISTE DES FIGURES | VIII |
| LISTE DES TABLEAUX..... | XI |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | XII |
| REMERCIEMENTS..... | XIV |
| CHAPITRE 1 : INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 Métabolisme énergétique..... | 2 |
| 1.2 La voie de la céto-genèse | 13 |
| 1.3 La voie de la céto-lyse | 16 |
| 1.4 L'implication de la céto-genèse et de la diète céto-gène dans les maladies | 17 |
| 1.5 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A lyase (HL) | 19 |
| 1.6 Déficience humaine en HL | 22 |
| 1.7 Modèles animaux des maladies CASTOR | 26 |
| 1.8 Expérience du laboratoire dans le domaine du métabolisme énergétique des lipides..... | 27 |
| 1.9 Hypothèse et but du projet..... | 28 |
| CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES | 29 |
| 2.1 Matériels | 30 |
| 2.2 Méthodes | 30 |
| 2.2.1 Création de la souris | 30 |
| 2.2.2 Conditions de l'animalerie..... | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.3 Changement de diète | 31 |
| 2.2.4 Buvarpage de type Southern..... | 31 |
| 2.2.5 Buvarpage de type Northern..... | 32 |
| 2.2.6 Immunobuvarpage de type Western | 32 |
| 2.2.7 Dosage de l'activité d'HL..... | 32 |
| 2.2.8 Isolement des hépatocytes | 32 |
| 2.2.9 Dosage de la cétoenèse | 33 |
| 2.2.10 Dosage du flux du cycle de Krebs | 34 |
| 2.2.11 Polarimétrie | 34 |
| 2.2.12 Extraction des acyls-CoA pour l'analyse par spectrométrie de masse | 34 |
| 2.2.13 Dosages métaboliques | 35 |
| 2.2.14 Acides organiques..... | 35 |
| 2.3 Rôle du candidat | 36 |
| CHAPITRE 3 : RÉSULTATS..... | 37 |
| 3.1 Validation de l'efficacité du ciblage génique | 38 |
| 3.2 Phénotype clinique | 44 |
| 3.3 Modifications effectuées afin d'obtenir un modèle adéquat pour les études métaboliques | 44 |
| 3.4 Observations biochimiques..... | 47 |
| 3.5 Isolement et évaluation de la qualité des hépatocytes | 48 |
| 3.6 Évaluation de l'activité de la cétoenèse..... | 51 |
| 3.7 Chaîne respiratoire mitochondriale | 51 |
| 3.8 Cycle de Krebs..... | 52 |
| 3.9 Dosage des acyls-CoA par spectrométrie de masse | 55 |
| 3.10 Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)..... | 62 |
| CHAPITRE 4 : DISCUSSION..... | 63 |
| 4.1 Validation génétique du ciblage | 64 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 Phénotype clinique | 66 |
| 4.3 Modifications effectuées afin d'obtenir modèle étudiable | 67 |
| 4.4 Observations biochimiques..... | 68 |
| 4.5 Isolement et évaluation de la qualité des hépatocytes | 70 |
| 4.6 Évaluation de l'activité de la cétogenèse..... | 72 |
| 4.7 Chaîne respiratoire..... | 72 |
| 4.8 Cycle de Krebs..... | 73 |
| 4.9 Autres voies | 75 |
| 4.10 Dosage des acyls-CoA par spectrométrie de masse | 76 |
| 4.11 Spectrométrie par résonnance magnétique nucléaire (RMN)..... | 78 |
| 4.12 Portrait global du métabolisme protéique et énergétique des souris HLLKO. | 82 |
| 4.13 Perspectives futures du projet..... | 83 |
| CHAPITRE 5 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 85 |

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Résumé du métabolisme du CoA

Figure 2a : Physiopathologie des maladies de type CASTOR, la déficience en HL comme exemple

Figure 2b : Compartimentation des voies de la cétogenèse et de la production du cholestérol

Figure 3 : Métabolisme des corps cétoniques

Figure 4: Représentation schématique de mutations présentement identifiées dans le gène HMGCL humain

Figure 5: Vecteurs du ciblage génique conditionnel pour l'exon 2 d'HL

Figure 6 : Buvardage de type Southern d'extraits de foie de souris de différents génotypes

Figure 7 : Buvardage de type Northern d'ARN extraits de foie de souris normale et invalidé en HL

Figure 8 : Immunobuvardage de type Western sur la protéine HL effectué à partir d'extraits mitochondriaux de foie de souris normale et invalidées en HL

Figure 9 : Activité enzymatique d'HL de différentes fractions de foie de souris normales et invalidées en HL

Figure 10 : Courbes de survie de type Kaplan-Meyer des souris HLLKO avec et sans modification de diète en comparaison avec un groupe contrôle

Figure 11: Coupes histologiques de foie de souris colorées à l'huile rouge

Figure 12: Hépatocytes, isolés par la technique de perfusion à la collagénase en 2 étapes, colorés au bleu de Trypan

Figure 13: Effet de la concentration d'octanoate sur la céto-genèse dans les hépatocytes isolés à partir de souris normales ou invalidées en HL

Figure 14: Effets de la concentration d' α -KIC sur la production de $^{14}\text{CO}_2$ à partir de $[2-^{14}\text{C}]$ pyruvate par les hépatocytes isolés de souris normales et HLLKO

Figure 15a: Spectre en scan du glutaryl-CoA pur analysé par spectrométrie de masse en injection électronique et détection en mode négatif

Figure 15b: Spectre du glutaryl-CoA pur obtenu après décomposition induite par collision dans un spectromètre de masse à triple quadrupoles

Figure 15c: Spectre en scan du HMG-CoA pur analysé par spectrométrie de masse en injection électronique et détection en mode négatif

Figure 15d: Spectre du HMG-CoA pur obtenu après décomposition induite par collision dans un spectromètre de masse à triple quadrupoles

Figure 16(a-c): Identification des acyls-CoA dans le foie. De haut en bas sont présentés des extraits suivants : foie normal, foie d'une souris HLLKO mais stable sur le plan clinique et foie d'une souris HLLKO en décompensation.

Figure 17: Résumé des résultats obtenus par résonnance magnétique nucléaire (RMN) de l'évaluation du métabolisme énergétique hépatique des souris HLLKO suite à l'injection de [U-¹³C₆]Glucose

Figure 18 : Physiopathologie de la déficience en HL dans le foie de souris, basée sur les résultats obtenus à ce jour

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les maladies CASTOR et le dépistage néonatal

Tableau II : Mutations dans le gène *HMGCL*

Tableau III: Concentrations d'acides organiques (mg/g créatinine) dans l'urine de souris HLLKO et contrôle et valeurs de référence chez l'homme

Tableau IV: Dosage de l'activité de la chaîne respiratoire dans les mitochondries isolées de foie de souris HLLKO et normales

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|------------|---|
| 3HB | 3-hydroxybutyrate |
| 3HBDH | 3-hydroxybutyrate déshydrogénase |
| AcAc | Acétoacétate |
| AcAc-CoA | Acétoacétyl-CoA |
| AC-CoA | Acétyl-CoA |
| ADP | Adénosine bis-phosphate |
| ATGL | Adipose triglyceride lipase |
| ATP | Adénosine tris-phosphate |
| BCKADH | Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase |
| CASTOR | CoA Sequestration, Toxicity Or Redistribution |
| CHYL | Chylomicrons |
| CoA | Coenzyme A |
| CPT | Carnitine palmitoyl transférase |
| DIC | Décomposition induite par la collision |
| EIM | Erreurs innées du métabolisme |
| FA | Acides gras (Fatty acids) |
| Ftms | fourier-transform mass spectrometry |
| GC-MS | Gas-Chromatography Mass-spectrometer |
| G-CoA | Glutaryl-CoA |
| HL | 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase |
| HLLKO | HL liver specific KO |
| HMG-CoA | 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA |
| HPLC-MS | High performance liquid chromatography- mass spectrometry |
| i.p. | Intrapéritonéal |
| LCAD | Long-chain acyl-CoA Déshydrogénase |
| LC-CoA | Acyl-CoA à chaîne longue |
| LCHAD | Long-chain 3-hydroxyacyl CoA Déshydrogénase |
| LHS | Lipase hormono-sensible |
| <i>m/z</i> | ratio masse/charge |

| | |
|---------------|---|
| MCAD | Medium-chain acyl-CoA Déshydrogénase |
| MC-CoA | Acyl-CoA à chaîne moyenne |
| mHS | HMG-CoA synthase mitochondriale |
| MS | Spectrométrie de masse |
| OA | Acides organiques |
| PANK | Pantothénate kinase |
| PC | Pyruvate carboxylase |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PDH | Pyruvate déshydrogénase |
| RCR | Ratio du contrôle respiratoire |
| RMN | Résonnance magnétique nucléaire |
| SCAD | Short-chain acyl-CoA Déshydrogénase |
| SC-CoA | Acyl-CoA à chaîne courte |
| SCOT | Succinyl-CoA : 3-Oxoacid CoA Transférase |
| T2 | Mitochondrial AcAc-CoA thiolase |
| VLCAD | Very-long-chain acyl-CoA Déshydrogénase |
| VLDL | Lipoprotéines à très faible densité (very-low density lipoproteins) |
| α -KIC | alpha-ketoisocaproate |
| β -Ox | β -oxydation |

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon patron, Dr Grant Mitchell, pour sa passion contagieuse pour le monde de la génétique biochimique ainsi que pour m'avoir donné la chance de travailler sur un si beau projet. Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire, particulièrement Shupeï pour sa disponibilité et pour les nombreuses réponses à mes questions. Merci également à Chantal pour m'avoir aidé à régler mes petits problèmes de mise en page.

Merci également à ma marraine de maîtrise, partenaire d'entraînement du midi, qui avait toujours de bonnes solutions à toutes mes questions et inquiétudes pendant nos séances de course.

Merci à François Normant qui a eu l'extrême gentillesse de me prêter un ordinateur portable durant la rédaction de ce mémoire.

Je tiens également à souligner l'extraordinaire soutien de ma famille tout au cours de ma maîtrise, merci de m'avoir encouragé mais également enduré et écouté quand je m'emportais en parlant de mon projet avec détails ;)

Finalement, je tiens à rendre hommage et à remercier du plus profond de mon cœur ma conjointe, qui a fait preuve d'énormément de patience et de compromis. Une grosse partie de ce mémoire te revient Émilie!

**Comme la rosée du matin permet à la fleur de pousser, la
sueur de l'effort permet à l'homme de vieillir en beauté!!**

P.H. Bergeron, lors de son marathon complété en 5h41min à 80 ans

La Baie, le 28 Octobre 2006

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique est à la base de la vie. Son bon fonctionnement est essentiel pour le maintien d'une bonne qualité de vie et même simplement de la vie. Les erreurs innées du métabolisme (EIM) sont un groupe de maladies génétiques affectant les enfants qui ont des conséquences dramatiques sur leurs vies par des mécanismes qui sont encore mal connus. C'est via leur transformation en acides organiques que les différents aliments produisent de l'énergie. Ce projet porte sur une erreur innée du métabolisme conduisant à une acidurie organique du métabolisme énergétique. Dans un modèle de souris, nous caractérisons la physiopathologie de cette condition dans le but de comprendre cette même maladie génétique chez les enfants et d'offrir un meilleur traitement.

Lors de leur transport, transformation ou dégradation, les acides organiques vont se lier de façon covalente à des molécules qui les activent pour sa dégradation oxydative. La majorité du temps, il s'agit d'une thioester avec le Coenzyme A (CoA).

Le CoA est produit à partir de l'acide pantothénique (figure 1), une vitamine abondamment retrouvée dans l'alimentation. La première enzyme, la pantothénate kinase (PANK), qui catalyse l'étape limitante, est inhibée par les acyls-CoA et possède 4 isoformes. La PANK 2 est la seule isoforme mitochondriale (Johnson et al., 2004). Sa déficience, due à une mutation génique, cause une maladie héréditaire neurodégénérative auparavant nommée la maladie d'Hallervorden-Spatz (Hayflick et al., 2003). Il a été démontré qu'une augmentation du pantothénate dans l'alimentation peut augmenter le contenu hépatique en CoA (Lahjouji et al., 2001). Le CoA et les acyls-CoA ne traversent pas librement les membranes biologiques. Malgré tout, il existe un système d'import mitochondrial dépendant du potentiel membranaire impliquant un système de transporteur (Tahiliani, 1989). L'injection intraveineuse de 55 $\mu\text{mol/kg}$ de CoA libre chez le rat a permis une augmentation d'environ 1.5x de la

concentration hépatique de CoA (Tholen and Mordhorst, 1976), mais sa localisation intracellulaire n'a pas été déterminée. Ces travaux laissent croire qu'une charge en CoA pourrait possiblement augmenter la concentration de CoA intracellulaire.

Malgré tout, il manque de nombreuses données à notre connaissance de la synthèse du CoA, de sa dégradation et des méthodes qui permettraient de manipuler sa concentration. L'importance de PANK2 dans la synthèse mitochondriale du CoA n'est toujours pas prouvée, malgré une activité PANK démontrée (Kotzbauer et al., 2005). La synthèse du CoA à l'intérieur de la mitochondrie n'a pas été documentée (Tahiliani and Beinlich, 1991).

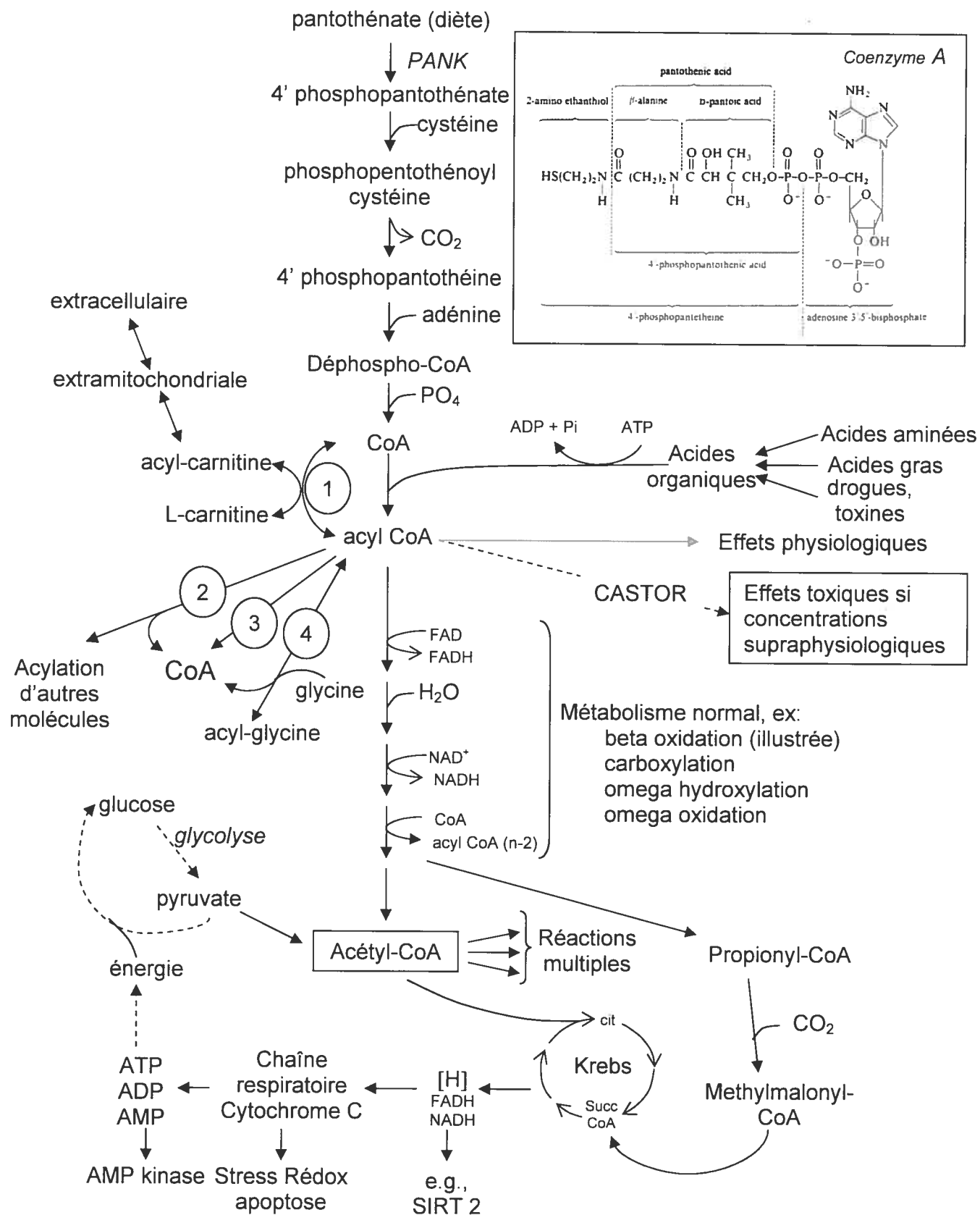


Figure 1 : Résumé du métabolisme du CoA. La légende est à la page 5

Légende de la figure 1 : Quatre méthodes pour la liaison du CoA sont illustrées : 1, carnitine acyl transférase; 2, réaction d'acylation; 3, clivage par thioestérase; 4, glycine transférase. Des liens possibles à des voies métaboliques sont présentés au bas de la figure.

Les thioesters acyl-CoA participent à de nombreuses réactions métaboliques. Plusieurs erreurs innées du métabolisme (EIM) résultent de la déficience génétique d'une ou plusieurs de ces réactions. Ces maladies génétiques sont regroupées sous l'appellation CASTOR (CoA Sequestration, Toxicity Or Redistribution). Ces maladies sont caractérisées par un profil anormal de métabolites sanguins et urinaires. Les métabolites détectés proviendraient des acyls-CoA directement en amont de l'étape enzymatique déficiente. Le niveau anormal d'acyl-CoA n'a jamais été démontré directement dans une maladie CASTOR. La validation de cette hypothèse fera partie intégrante de mon projet. Le CoA libre participe à de nombreuses réactions du métabolisme énergétique intracellulaire telles qu'au niveau du cycle de Krebs et de la dégradation des acides aminés.

L'hypothèse centrale de la physiopathologie des maladies de type CASTOR, telle qu'illustrée dans la figure 1, est qu'une déficience enzymatique entraînant une accumulation des précurseurs de la voie provoque un déséquilibre dans le métabolisme du CoA. L'accumulation des acyls-CoA en amont entraîne une séquestration des CoA libres. Cette baisse de disponibilité de CoA libre va entraîner la diminution d'activité de différentes voies métaboliques ainsi que des composés centraux du métabolisme énergétique tels que l'acétyl-CoA. Une autre dimension de cette hypothèse est que l'accumulation des composés en amont ainsi que l'absence des produits de la voie bloquée, tels les corps cétoniques démontré dans l'exemple de la figure 2a, pourraient contribuer à la toxicité de ces maladies. Des transporteurs tels que la carnitine vont permettre d'évacuer les acyls accumulés dans la mitochondrie (Lahjouji et al., 2001). L'organisme va réussir à se débarrasser des métabolites sous forme d'acides organiques urinaires (Sweetman, 2001). C'est d'ailleurs la détection de ces métabolites qui permet souvent de poser un diagnostic qui orientera spécifiquement les médecins vers un dosage enzymatique spécifique ou des analyses moléculaires (Mitchell, 2001). Chaque maladie CASTOR possède son propre profil d'acides organiques urinaires (Sweetman, 2001). Cette hypothèse globale de déséquilibre du

métabolisme du CoA est à la base de certains traitements utilisés en clinique de génétique médicale. Par exemple, des suppléments de L-carnitine sont donnés aux patients pour favoriser la sortie des acyls accumulés (Roe et al., 1984). Un autre traitement consiste en une prise de pantothénate, le précurseur du CoA, afin d'augmenter la concentration intra-mitochondriale de CoA. L'impact réel de ces deux traitements n'est pas fermement démontré (Van Hove et al., 1994).

Bien que la plupart de ces maladies soit très bien caractérisée au niveau génétique et enzymatique ainsi qu'au niveau des différents métabolites présents dans l'urine et le sang, l'origine au niveau cellulaire des symptômes observés chez le malade est encore obscure. De plus, tel que démontré dans le tableau I, 18 des 37 maladies incluses dans les programmes de dépistage néonatal élargi (qui s'applique à la majorité des naissances en Amérique du Nord et dont l'application est à l'étude au Québec) sont des conditions CASTOR. Ce qui permettra une détection complète des maladies CASTOR. Ceci augmentera le nombre de cas diagnostiqués puisqu'il s'agit, dans de nombreux cas, de maladies souvent découvertes seulement après une première crise fatale ou mal diagnostiquées étant donné leur rareté. Leur inclusion dans le programme de dépistage va permettre d'avoir un diagnostic précis sur la maladie de l'enfant. Les traitements des maladies CASTOR sont sous-optimaux et nous avons peu de connaissances de leur physiopathologie. La prise en charge rapide des patients présymptomatiques, combinée à un traitement adéquat, représentent un défi majeur pour la génétique biochimique.

Diverses techniques ont été développées pour permettre de mieux comprendre les maladies de type CASTOR. Tout d'abord, du côté clinique, le dosage des acides organiques ainsi que l'analyse rapide des métabolites sanguins ont permis aux médecins généticiens d'établir des portraits globaux spécifiques à chaque erreur innée du métabolisme (Sweetman, 2001). Plusieurs techniques de dosage des métabolites intracellulaires existent à l'heure actuelle. Tout d'abord, une technique d'analyse des CoA a été mise au point à l'aide d'un HPLC

(Woldegiorgis et al., 1985). Bien que la technique ait démontré son efficacité, son utilisation en clinique est limitée due à la grande quantité de tissus nécessaire (environ 100 mg). Plus récemment, l'utilisation du spectromètre de masse a permis des progrès majeurs dans la détection des acyls-CoA. La technique a été utilisée majoritairement pour la détection d'acyls-CoA à chaînes longues (Kalderon et al., 2002). Minkler et coll. (2006) décrivent une méthode d'isolement du malonyl-CoA et son analyse par HPLC-MS.

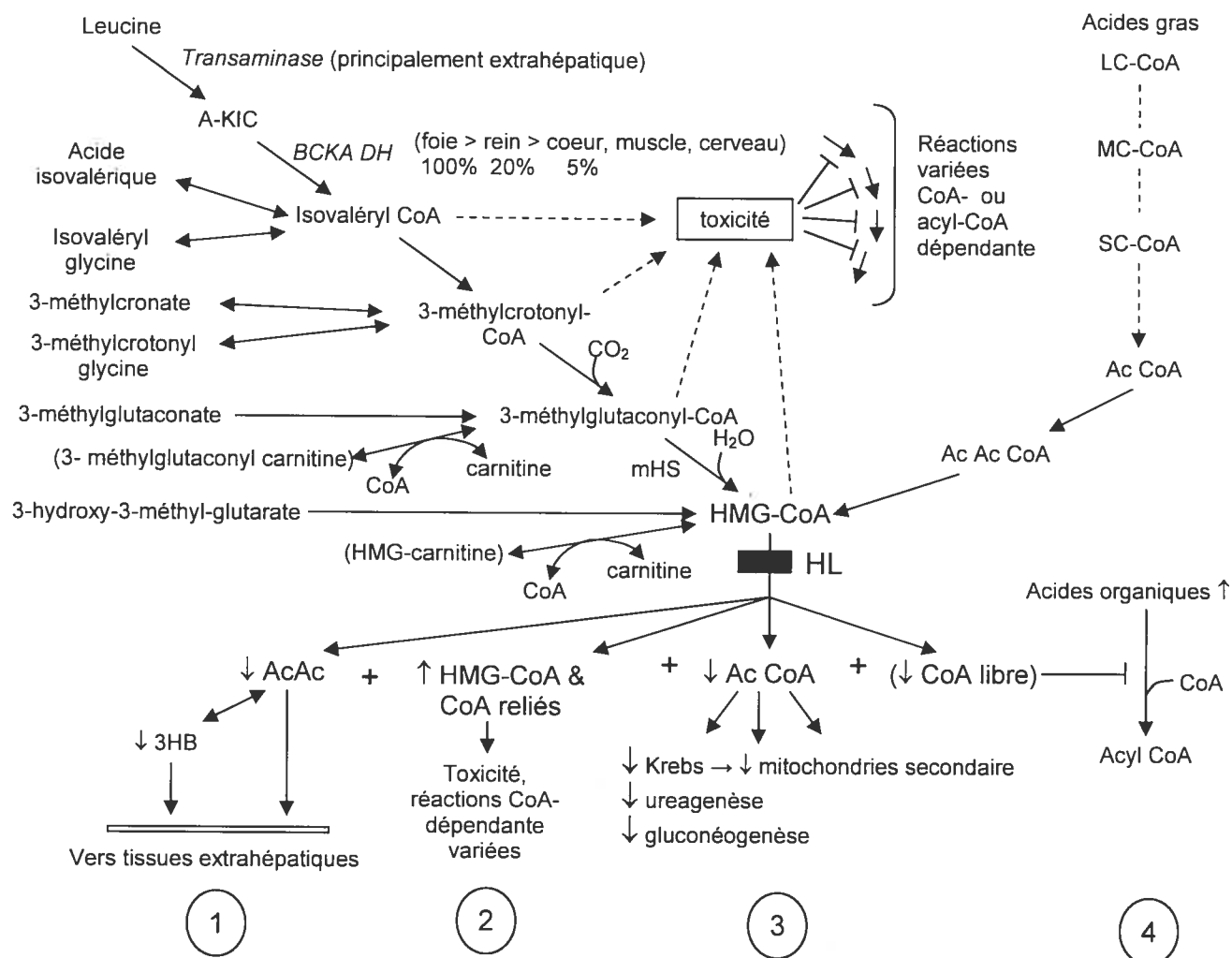


Figure 2 : Physiopathologie des maladies de type CASTOR, la déficience en HL comme exemple. L'activité tissu-spécifique, de la BCKADH (Branched chain ketoacid dehydrogenase) est démontré en fonction du foie (Wohlhueter and Harper, 1970). Au bas de la figure, quatre mécanismes potentiels de toxicité sont présentés pour la déficience en HL : (1) le manque de corps cétoniques pour les organes extrahépatiques, (2) l'augmentation toxique d'acyls-CoA spécifiques, (3) la diminution de la concentration d'acétyl-CoA et (4) la diminution du CoA libre

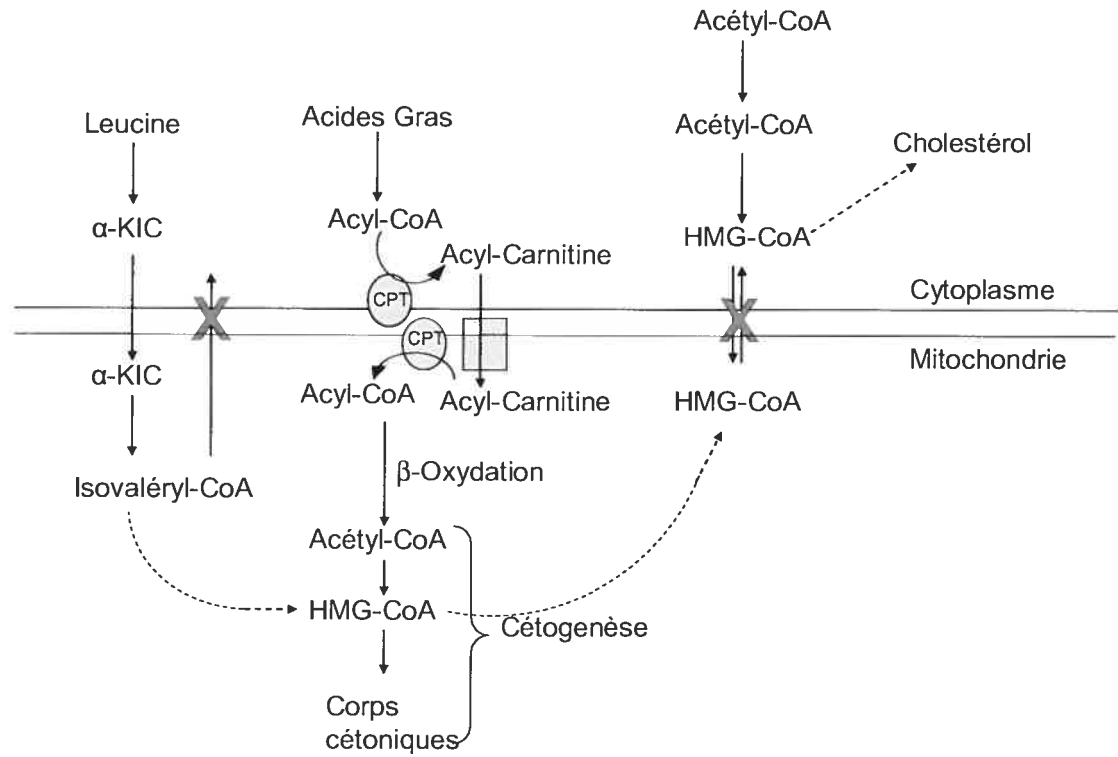


Figure 2b : Compartimentation des voies de la cétogenèse et de la production du cholestérol. Les acyls-CoA ne peuvent pas traverser la membrane mitochondriale.

| Maladies | Cible Primaire ? | Maladie CASTOR? | Pointage | Rang (%ile) |
|--|------------------|-----------------|----------|-------------|
| Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency | Oui | + | 1799 | 1.00 |
| Congenital hypothyroidism | Oui | | 1718 | 0.99 |
| Phenylketonuria | Oui | | 1663 | 0.98 |
| Neonatal hyperbilirubinemia (Kernicterus) | Oui | | 1584 | 0.96 |
| Biotinidase deficiency | Oui | + | 1566 | 0.95 |
| Sickle cell anemia (Hb SS disease) Hb | Oui | | 1542 | 0.94 |
| Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) | Oui | | 1533 | 0.93 |
| Isovaleric acidemia | Oui | + | 1493 | 0.89 |
| Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency | Oui | + | 1493 | 0.89 |
| Maple syrup disease | Oui | | 1493 | 0.89 |
| Classical galactosemia | Oui | | 1473 | 0.88 |
| Hb S/ β -thalassemia | Oui | | 1455 | 0.87 |
| Hb S/C disease | Oui | | 1453 | 0.86 |
| Long-chain L-3-OH acyl-CoA dehydrogenase deficiency | Oui | + | 1445 | 0.84 |
| Glutaric acidemia type I | Oui | + | 1435 | 0.83 |
| 3-Hydroxy-3-methylglutaric Acidemia | Oui | + | 1420 | 0.82 |
| Trifunctional protein deficiency | Oui | + | 1418 | 0.81 |
| Multiple carboxylase deficiency | Oui | + | 1386 | 0.80 |
| Benign hyperphenylalaninemia | Oui | | 1365 | 0.78 |
| Methylmalonic acidemia (mutase deficiency) | Oui | + | 1358 | 0.77 |
| Homocystinuria (due to CBS deficiency) | Oui | | 1357 | 0.76 |
| 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency | Oui | + | 1355 | 0.75 |
| Hearing loss | Oui | | 1354 | 0.73 |
| Methylmalonic acidemia (Cbl A,B) | Oui | + | 1343 | 0.72 |
| Propionic acidemia | Oui | + | 1333 | 0.71 |
| Carnitine uptake defect | Oui | + | 1309 | 0.69 |
| Galactokinase deficiency | Oui | | 1286 | 0.69 |
| Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency | Oui | | 1286 | 0.67 |
| β -Ketothiolase deficiency | Oui | + | 1282 | 0.66 |
| Citrullinemia | Oui | | 1266 | 0.65 |
| Argininosuccinic acidemia | Oui | | 1263 | 0.64 |
| Tyrosinemia type I | Oui | | 1257 | 0.63 |
| Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency | Oui | + | 1252 | 0.61 |
| Tyrosinemia type II | Oui | | 1249 | 0.60 |
| Glutaric acidemia type II | Oui | + | 1224 | 0.59 |

| | | | | |
|---|-----|---|------|------|
| Medium/short-chain L-3-OH acyl-CoA dehydrogenase deficiency | Oui | + | 1223 | 0.58 |
| Cystic fibrosis | Oui | | 1200 | 0.57 |
| Variant Hb-pathies (including HB E) | Non | | 1199 | 0.55 |
| Human HIV infection | Non | | 1193 | 0.54 |
| Defects of bipterin cofactor biosynthesis | Non | | 1174 | 0.53 |
| Medium-chain ketoacyl-CoA thiolase deficiency | Non | + | 1170 | 0.52 |
| Carnitine palmitoyltransferase II deficiency | Non | + | 1169 | 0.51 |
| Methylmalonic acidemia (Cbl C,D) | Non | + | 1166 | 0.49 |
| Argininemia | Non | | 1151 | 0.48 |
| Tyrosinemia type III | Non | | 1149 | 0.47 |
| Defects of bipterin cofactor regeneration | Non | | 1146 | 0.46 |
| Malonic acidemia | Non | + | 1143 | 0.45 |
| Carnitine: acylcarnitine translocase deficiency | Non | + | 1141 | 0.43 |
| Isobutyryl-CoA dehydrogenase deficiency | Non | + | 1134 | 0.42 |
| 2-Methyl 3-hydroxybutyric aciduria | Non | + | 1132 | 0.41 |
| Carnitine palmitoyltransferase I deficiency (liver) | Non | + | 1131 | 0.40 |
| 2-Methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency | Non | + | 1124 | 0.39 |
| Hypermethioninemia | Non | | 1121 | 0.37 |
| Dienoyl-CoA reductase deficiency | Non | + | 1119 | 0.36 |
| Galactose epimerase deficiency | Non | | 1066 | 0.35 |
| 3-Methylglutaconic aciduria | Non | + | 1057 | 0.34 |
| Severe combined immunodeficiency | Non | | 1047 | 0.33 |
| Congenital toxoplasmosis | Non | | 1041 | 0.31 |
| Familial hypercholesterolemia (heterozygote) | Non | | 1038 | 0.30 |
| Carnitine palmitoyltransferase I deficiency (muscle) | Non | + | 1009 | 0.29 |

Tableau I : Les maladies CASTOR et le dépistage néonatal.

Adapté du tableau 1 du rapport pour le Département de la Santé et des Services Sociaux États-Unis par *The American College of Medical Genetics, Newborn Screening: Toward a Uniform Screening Panel and System* (<http://mchb.hrsa.gov/screening/>). Les maladies sont classées par leur incidence, leur facilité de dépistage et l'impact thérapeutique. Les maladies dont le pointage est >1200 étaient considérées comme cible pour le dépistage néonatal. De 37 de ces conditions, 18, incluant la déficience en HL (en gras), impliquent des intermédiaires acyls-CoA. Douze autres conditions CASTOR ont été classées comme cibles secondaires (pointage entre 1000 et 1200).

1.2 La voie de la cétogenèse

Le CoA tel que démontré ci-dessus, est entre autres impliqué dans le cycle de Krebs, la néoglucogenèse, l'uréagenèse ainsi que plusieurs voies de dégradation protéique. Il est également central à la voie de la cétogenèse présentée dans la figure 2 (p.8). Celle-ci est principalement active au niveau du foie et est activée lors de faible disponibilité de glucose tel lors du jeûne (Mitchell, 2001). Il existe 2 points d'entrée à la cétogenèse, soit les acides gras et la dégradation de la leucine. La cétogenèse produit les corps cétoniques, des petites molécules à quatre carbones, l'acétoacétate (AcAc) et le β -hydroxybutyrate (3HB) (Mitchell, 2001). Ceux-ci sont d'importants vecteurs d'énergie pour les tissus extrahépatiques tels que le cerveau où ils peuvent contribuer jusqu'à 60% de la consommation énergétique (Owen et al., 1967).

Le niveau normal des corps cétoniques dans le sang à l'état nourri est de $< 0,3$ mM, alors qu'il sera à un niveau d'environ 50 à 65% du niveau sanguin dans le liquide céphalo-rachidien (Owen et al., 1974). Ce taux sanguin fluctue en fonction du statut métabolique du patient. De façon normale, le niveau augmente lors du jeûne. L'hypercétonémie est caractérisée par un niveau de corps cétoniques de $> 2,0$ mM alors que l'acidocétose est définie par une concentration de $> 7,0$ mM (Mitchell, 2001). Les hautes concentrations de corps cétoniques sont associées à certaines conditions pathologiques telles que le diabète mal contrôlé. Un taux anormalement bas, voir pratiquement nul suite à un jeûne, est observé chez les patients présentant une déficience enzymatique de la cétogenèse. Le ratio plasmatique de 3HB/AcAc est normalement d'environ 1 et peut augmenter à 5-6 après une semaine de jeûne (Cahill et al., 1966; Marliss et al., 1978; Owen et al., 1969).

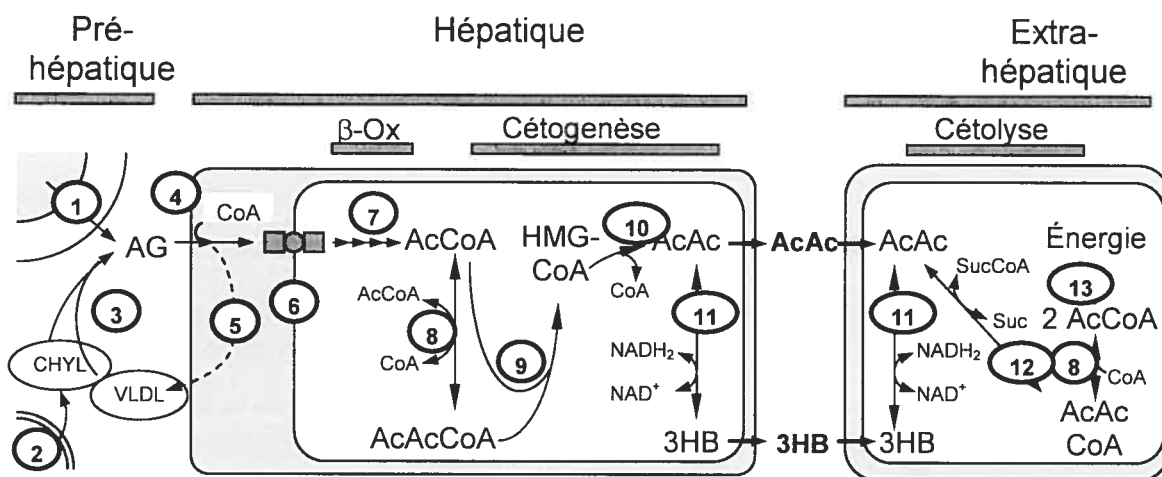


Figure 3 : Métabolisme des corps cétoniques. (Fukao et al., 2004) La légende est présentée à la page 15.

Légende de la figure 3 : Les étapes majeures du métabolisme sont numérotées dans la figure 3. Durant le jeûne, les acides gras circulants sont dérivés majoritairement de la lipolyse adipocytaire (1). Dans des conditions d'abondance en nutriments, les triglycérides sont présents à des niveaux élevés dans les lipoprotéines circulantes telles que les chylomicrons (CHYL, 2) et les lipoprotéines à très faible densité (VLDL). Les triglycérides des lipoprotéines sont clivés par les lipases endothéliales pour relâcher les acides gras non-estérifiés (3). À l'intérieur de la cellule, les acides gras sont activés en acyl-CoA à longues chaînes par l'acyl-CoA synthase (4). Les acyls-CoA ainsi produits vont être utilisés soit pour la synthèse de triglycérides dans les lipoprotéines (5), dans les phospholipides, dans les sphingolipides ou pour la conversion en esters de carnitine pour le transport dans la mitochondrie pour l'oxydation (6). Dans la matrice mitochondriale, les acyls-CoA provenant des acides gras sont dégradés par les cycles de la β -oxydation (7). Chaque cycle produit une molécule d'AcCoA en plus d'une molécule de NADH, une de FADH et un acyl-CoA raccourci de deux carbones. Il existe plusieurs types d'enzymes dans la β -oxydation, avec une spécificité pour les acyls-CoA à chaînes longues ($>C12$), à chaînes moyennes ($C6-C12$) et à chaînes courtes ($C4$). La concentration intracellulaire d'AcCoA et d'AcAcCoA est équilibrée par l'action de l'AcAc-CoA thiolase mitochondriale (T2) (8). Le HMG-CoA est synthétisé par l'action de la mHS (9), pour ensuite être clivé par l'HL (10) pour produire de l'AcAc libre. AcAc peut être converti de façon réversible en 3HB par l'enzyme R-3HB déshydrogénase (3HBDH, 11). Le ratio de 3HB sur AcAc reflète l'état redox à l'intérieur de la matrice mitochondriale. AcAc et 3HB diffusent dans la circulation. Dans les tissus extrahépatiques, l'AcAc est activé en AcAcCoA par SCOT (12). L'AcCoA, produit par l'action de T2, peut ensuite se diriger vers l'oxydation et alimenter la synthèse d'ATP (13, pas illustré en détail dans la figure 3).

1.3 La voie de la cétolyse

La cétolyse permet d'utiliser les corps cétoniques comme source d'énergie (Mitchell, 2001). Grâce à la réversibilité de la réaction de 3HBDH, le 3HB est reconverti en AcAc. Ce dernier est transformé en AcAc-CoA par l'enzyme Succinyl-CoA :3-ketoacid-CoA transferase (SCOT). Par la suite, l'enzyme T2 (mitochondrial acetoacetyl-CoA Thiolase) convertit l'AcAc-CoA en Acétyl-CoA qui sera utilisé dans le métabolisme énergétique du cycle de Krebs. L'enzyme SCOT et par le fait même, la cétolyse, sont exclusivement extrahépatiques. Donc, le foie, principal producteur de corps cétoniques, ne peut pas les utiliser pour ses propres besoins énergétiques. La capacité d'effectuer la cétolyse dans les différents tissus varie directement en fonction de l'expression de SCOT : cœur (désigné comme 100%) > rein (70%) > cerveau (10%) > muscles squelettiques (5%) > foie (indéetectable) (Mitchell, 2001). L'utilisation des corps cétoniques est proportionnelle au taux circulant dans le sang. Malgré cela, après 2 semaines de jeûne, le niveau sanguin des corps cétoniques augmente malgré un niveau de cétogénèse constant. Ceci suggère que la cétolyse pourrait être diminuée lors du jeûne prolongé. D'ailleurs, une concentration d'AcAc supérieure à 5 mM inhibe l'activité de SCOT (Fenselau and Wallis, 1974), mais il n'existe aucune preuve que cette inhibition soit physiologiquement significative.

Il existe des déficiences connues pour chacune des deux enzymes de la cétolyse (Mitchell, 2001). La déficience en SCOT (OMIM245050) est caractérisée par une mutation dans le gène OXCT sur le chromosome 5p12-p13. La déficience en T2 (OMIM 203750), survient lors de la présence de mutation sur le gène ACAT1 situé sur le chromosome 11q22.3-q23.1. Ces deux maladies se manifestent par des épisodes d'acidocétoses sévères, provoqués souvent par le jeûne typiquement dans un contexte d'infection virale.

1.4 L'implication de la céto-genèse et de la diète céto-gène dans les maladies

La céto-genèse est impliquée secondairement dans plusieurs maladies. Dans le diabète de type 1, la céto-genèse est particulièrement active. La présence d'une forte concentration de corps cétoniques est fréquente chez le diabétique de type 1 (Mitchell et al., 1995). Étant donné que le diabète mal contrôlé entraîne une impression de jeûne permanent, les voies métaboliques productrices d'énergie telles que la céto-genèse, seront fortement activées. Le niveau plasmatique de corps cétoniques retrouvé chez un diabétique peut excéder 23 mM.

La céto-genèse est également induite comme traitement de l'épilepsie. La diète céto-gène est une avenue thérapeutique pour diminuer les crises chez le patient épileptique (Swink et al., 1997). Cette diète est caractérisée par une teneur élevée en acides gras. Dans une formulation typique de cette diète (4 :1), 87% de l'énergie provient des acides gras alimentaires alors qu'en moyenne dans la diète nord-américaine standard, il s'agit d'environ 35% (Mitchell et al., 1995). L'appellation 4 : 1 indique que le rapport entre la masse de lipides sur la masse de glucides est de 4 : 1. En clinique, ce rapport est ajusté selon l'effet anticonvulsivant et le niveau des corps cétoniques sanguin. La haute teneur d'acides gras dans la diète engendre une activation de la céto-genèse et va entraîner une céto-se chez le patient. La concentration des corps cétoniques dans le sang peut atteindre des niveaux aussi élevés que 4 mM de 3HB et 1,5 mM d'AcAc chez certains patients.

Il est reconnu depuis longtemps que la céto-se a un effet anticonvulsivant et diminue la fréquence des crises dans plusieurs types d'épilepsie (Huttenlocher, 1976). Toutefois, l'utilisation thérapeutique de la diète céto-génique a ses limites. Le problème le plus fréquemment rencontré est le manque de compliance du régime puisqu'une légère ingestion de glucides provoque une diminution rapide du niveau de corps cétoniques et engendre le retour des crises. Ce problème de compliance peut être expliqué, entre autres, par le manque de goût de la diète et

par la présence non-suspectée du glucose, par exemple dans certains médicaments et sirops. De plus, la diète cétogène peut engendrer de l'obésité et peut également produire une déficience de certains nutriments (Dodson et al., 1976). La mise au point de la diète et le suivi des patients doivent être effectués par un diététiste expérimenté.

La diète cétogène est également utilisée dans la déficience en pyruvate déshydrogénase (PDH) (Falk et al., 1976). Le patient déficient en PDH ne peut produire l'acétyl-CoA à partir du pyruvate. La diète cétogène permettra d'offrir une source alternative d'acétyl-CoA par la β -oxydation des acides gras et dans les tissus extra-hépatiques par l'entremise des corps cétoniques et de la cétolyse.

Une forme allégée de régime hyperlipidique est employée dans les approches de perte de poids telles que le régime Atkins. Celui-ci privilégie, en effet, une faible ingestion de glucides et favorise les protéines et les lipides. Ces derniers représentent environ 50 à 65% des sources d'énergie dans l'alimentation. Bien qu'efficace dans la perte de poids, la communauté scientifique émet de nombreuses mises en garde face à l'adoption d'une telle diète. Plusieurs cas répertoriés dans la littérature ont eu de graves problèmes de santé tels qu'une acidocétose et une pancréatite lors de l'adoption d'un tel régime (Chen et al., 2006).

La cétogénèse est principalement active au niveau du foie et ce, majoritairement lors d'épisodes de jeûne. Elle est régulée à trois niveaux (Mitchell et al., 1995) : 1) par l'activité lipolytique dans les adipocytes par les lipases tels que la lipase hormono-sensible (Fortier et al., 2004), la carboxylestérase-3 (Soni et al., 2004) et l'ATGL (adipose triglyceride lipase) (Haemmerle et al., 2006). Ces lipases fournissent les acides gras pour la cétogénèse. 2) par le niveau hépatique de malonyl-CoA. Ce dernier est synthétisé par l'acétyl-CoA carboxylase et dégradé par la malonyl-CoA décarboxylase. Le malonyl-CoA inhibe la carnitine palmitoyl transférase (CPT1) (Mitchell, 2001),

l'enzyme responsable de l'entrée des acides gras au niveau moléculaire. 3) l'enzyme HMG-CoA synthase mitochondriale (mHS) (Mitchell, 2001). L'activité de la mHS est augmentée en période de jeûne, par le diabète de type 1 (Serra et al., 1993), par l'administration d'une diète élevée en acides gras et durant la période postnatale. Le contrôle de l'expression de mHS est exercé autant au niveau de son ARNm qu'au niveau post-traductionnel à l'aide d'une succinylation réversible qui inhibe son activité.

1.5 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A lyase (HL)

Dans la dernière réaction enzymatique de la céto-genèse, le HMG-CoA est clivé par l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A lyase (HL) et produit l'acétyl-CoA et l'AcAc qui peut être converti en 3HB par l'enzyme 3-hydroxybutyrate déshydrogénase. Le HMG-CoA est le point de convergence de la voie de la β -oxydation des acides gras et de la voie de dégradation de la leucine (figure 2).

L'enzyme HL (HL, EC 4.1.3.4) (Mitchell, 2001) est un homodimère dont le précurseur de 325 résidus est clivé pour atteindre sa forme mature de 298 résidus.

Le promoteur du gène d'HL de souris contient un îlot CpG et plusieurs motifs de liaisons Sp1 mais ne contient aucune boîte TATA ou CAAT. Il y a plusieurs sites de départ de transcription à 9 – 35 bases en amont du codon du signal de départ (Wang et al., 1996). HL est exprimé dans tous les tissus étudiés à date, donc l'expression serait ubiquitaire. Une légère augmentation de l'activité est observée dans le foie de rats à jeun et nourris avec une diète riche en acides gras (Williamson et al., 1968) alors que l'activité peut quadrupler durant la transition fœto-néonatale.

L'ADNc d'HL a tout d'abord été cloné dans la bactérie *Pseudomonas mevalonii* pour ensuite être cloné dans le foie humain, de souris et de rat (Mitchell, 2001). Tous les tissus humains étudiés à date contiennent un ARNm d'HL d'environ 1,7 kb. Le gène d'HL a été cloné chez l'humain et la souris. Chez la souris, le locus du gène d'HL, *Hmgcl*, est situé sur le chromosome 4, dans une région homologue au locus humain, *HMGCL*, situé sur le chromosome humain 1p35.1-36.1. Chez la souris le gène d'HL contient 9 exons et possède une longueur d'environ 15 à 20 kb. Les exons 2 à 9 sont représentés de façon similaire chez la souris. Le signal d'entrée mitochondrial est situé sur les exons 1 (20 codons) et 2 (8 codons). Une région hautement conservée, incluant les codons pour les résidus catalytiques essentiels, l'arginine 41 et l'acide aspartique 42, est encodée par l'exon 2, tandis que les résidus essentiels histidine 233 et 235 (*cation binding*) sont situés au niveau de l'exon 7. Le codon cystéine 266 du site actif est au niveau de l'exon 8 alors que le signal d'entrée peroxisomale et le codon du signal d'arrêt de la traduction sont dans l'exon 9 (Wang et al., 1996).

HMG-CoA est également impliqué dans la voie de la production du cholestérol tel que présenté à la figure 2b. D'ailleurs, les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, prescrit dans le contrôle du taux de cholestérol, sont parmi les médicaments les plus vendus (Buemi et al., 2007). Or, bien que l'HMG-CoA soit présent dans les deux voies, la production du cholestérol est une réaction cytoplasmique alors que la cétogenèse est mitochondriale. Puisque les acyls-CoA ne peuvent pas traverser librement la membrane mitochondriale, il n'y aurait aucun lien entre les deux voies. Les groupements acyls, pour traverser la membrane mitochondriale, doivent se lier à la carnitine afin de passer par le système de navette lié aux CPT. D'ailleurs, le niveau de cholestérol chez les patients déficients en HL serait normal, selon une observation clinique (Dr. Grant Mitchell, donnée non-publiée). Notre modèle murin va permettre de vérifier cette indépendance entre la voie de la cétogenèse et de la production du cholestérol.

HL effectue une réaction Claisen inverse en trois étapes (Mitchell, 2001). Tout d'abord, l'enzyme enlève un proton du groupement 3-hydroxyl du HMG-CoA par un résidu au site actif servant de base générale. Ensuite, l'enzyme scinde le lien C2-C3 et produit de l'AcAc et un carbanion-CoA. Finalement, il y a une neutralisation du carbanion-CoA par un acide général du site actif pour créer l'acétyl-CoA. Dans son ensemble, la réaction est irréversible, bien que la dernière étape d'enolisation de l'acétyl CoA peut, dans une certaine mesure être réversible. La cystéine en position 266 dans l'HL humain est un résidu du site actif, probablement le récepteur de la première étape de la réaction lorsque HMG-CoA se lie à HL. D'autres résidus ont une implication directe dans la catalyse par HL. Grâce à des mutants naturels et synthétiques, des études ont démontré que l'histidine 233, l'arginine 41 et l'acide aspartique 42 sont également essentiels à la catalyse alors que l'histidine 235 est impliqué dans la liaison au métal. L'enzyme HL humaine possède un K_m de 21,2 μM , une V_{max} de 159 unités/mg de protéine et un taux de renouvellement de 158/s à un pH de 8,2 et 30°C pour HMG-CoA. HL est spécifique pour le diastéréoisomère (S) d'HMG-CoA, alors que la forme (R)-HMG-CoA (non-physiologique) n'est ni un substrat ou un inhibiteur de la réaction. La réaction d'HL requiert la présence de cations divalents. Le K_m pour Mg^{++} est 233 μM alors qu'il est de 1,5 μM pour Mn^{++} , avec une constante d'activation (K_a) de 0,5 μM . Le pH optimal d'HL est d'environ 9,2. Celui-ci augmente son potentiel catalytique dans la matrice mitochondriale puisque le pH y est d'environ 0,5 unités supérieur à celui rencontré dans le cytoplasme (Strzelecki et al., 1984).

La localisation d'HL est majoritairement mitochondriale mais il existe un signal d'entrée peroxisomale sous forme d'un tripeptide, Cys-Lys-Leu, à l'extrémité C-terminale d'HL humain (Mitchell, 2001). Environ 6% d'HL du foie humain et de la souris est peroxisomal. Ce taux est de 16 à 20% dans les fibroblastes et lymphoblastes humains ainsi que dans les cellules Hep G2. HL peroxisomale possède un pI plus basique (7,6 vs 6,2) ainsi qu'une masse supérieure à la protéine mitochondriale mature (34,5 kDa vs 32 kDa). Cette

différence de masse suggère que le signal d'entrée mitochondrial reste présent chez la protéine peroxisomale alors qu'il est retiré lors de l'entrée d'HL dans la mitochondrie. Le précurseur d'HL recombinant est enzymatiquement actif, aux mêmes K_m , V_{max} et pH optimal pour HMG-CoA que ceux pour l'HL naturel (Mitchell, 2001). Des études métaboliques ont permis de montrer une demi-vie de 13,5 à 19 heures pour HL mitochondrial et de 12 à 16 heures pour HL peroxisomal dans des cellules Hep G2, des fibroblastes et des lymphoblastes. (Ashmarina et al., 1999)

1.6 Déficience humaine en HL

La déficience humaine en HL a été décrite pour la première fois en 1976 (Faull et al., 1976). La déficience en HL est une maladie de type CASTOR qui est caractérisée par des crises d'hypoglycémie et d'acidose sans cétose durant lesquelles le système nerveux central est particulièrement vulnérable. Ces crises peuvent causer des handicaps permanents sévères pour le patient tels que le retard mental. Les risques de retard mental et d'épilepsie dans la déficience en HL dépassent ceux observés dans d'autres conditions présentant des hypoglycémies semblables au niveau de la longueur et de la sévérité. La déficience en HL est habituellement bien tolérée lorsque le patient n'est pas en crise. Lors de l'analyse de 62 cas de patients déficients en HL reportée, 30 d'entre eux ont consulté dans les premières semaines de vie (Mitchell, 2001). La plupart des autres patients atteints se sont présentés, quant à eux, avant l'âge d'un an et rarement après l'âge de deux ans. Habituellement, la grossesse et l'accouchement se déroulent normalement. Les épisodes de crises suivent habituellement un jeûne, une infection, un repas élevé en protéines et la transition fœtale – néonatale. Les patients vont présenter durant les crises, une hypoglycémie et une baisse du pH de modérée à sévère, pouvant aller jusqu'à une concentration de glucose sanguine indétectable, un pH $< 7,0$ (normal 7,2 – 7,4) et un niveau de bicarbonate $< 6,0$ mM (normal 21-26). Des vomissements, une léthargie, de la tachypnée et une hépatomégalie modérée avec une élévation des transaminases sériques sont

fréquemment rencontrés. L'hyperammoniémie a été rapportée et peut être sévère, $>1000 \mu\text{M}$ (normal <40) (Stacey et al., 1985). L'urine des patients peut posséder une odeur particulière, probablement due à la présence de l'acide 3-méthylcrotonique. (Sweetman, 2001)

Plusieurs patients présentent des anomalies de la matière blanche cérébrale, plus précisément au niveau des fibres arquées profondes qui vont être de faible densité en tomographie axiale et de haute intensité en imagerie par RMN-T2 (Mitchell, 2001). Une macrocéphalie, rapportée chez certains patients déficients en HL présentant des complications neurologiques sévères, pourrait être une conséquence de la maladie. D'un autre côté, une macrocéphalie augmenterait la consommation cérébrale ce qui accélérerait le développement d'une hypoglycémie. Des cas uniques de cardiomyopathie (Gibson et al., 1994), de pancréatite (Wilson et al., 1984), de surdité non-évolutive et de rétinite pigmentaire (Jones et al., 1997) ont été rapportés chez des patients déficients en HL. Des complications similaires sont retrouvées dans d'autres acidémies organiques, il est donc peu probable qu'il s'agisse de coïncidences. À date, les changements pathologiques observés sont non-spécifiques. De plus, une stéatose hépatique peut être observée chez ces patients. Une biopsie du cerveau chez un patient a démontré une gliose, une spongiose et une augmentation du contenu en glycogène des astrocytes (Mitchell, 2001).

Les patients déficients en HL présentent un patron distinctif d'acides organiques urinaires provenant des derniers métabolites de dégradation de la leucine, soit entre autres, l'acide 3-hydroxy-3-méthylglutarique, l'acide 3-méthylglutaconique et l'acide 3-hydroxyisovalérique (Sweetman, 2001). Bien que le patron observé soit caractéristique de la maladie, le diagnostique ne peut se baser uniquement sur les acides organiques puisque de rares cas ont présenté ce patron tout en ayant une activité d'HL normale. Donc, afin de confirmer le diagnostique de déficience en HL, un test enzymatique doit être réalisé dans les

fibroblastes. Ce dosage enzymatique spectrophotométrique est décrit dans la section "Matériels et Méthodes".

Plusieurs mutations peuvent être responsables de la déficience en HL et celles-ci sont distribuées dans tous les exons. Les mutations pathogènes sont concentrées dans l'exon 2. Il a été démontré que l'exon 2 contient plusieurs résidus du site actif (Forouhar et al., 2006). Cette haute concentration de mutations dans l'exon 2 fait de ce site une cible de choix pour la création d'un modèle murin de la maladie.

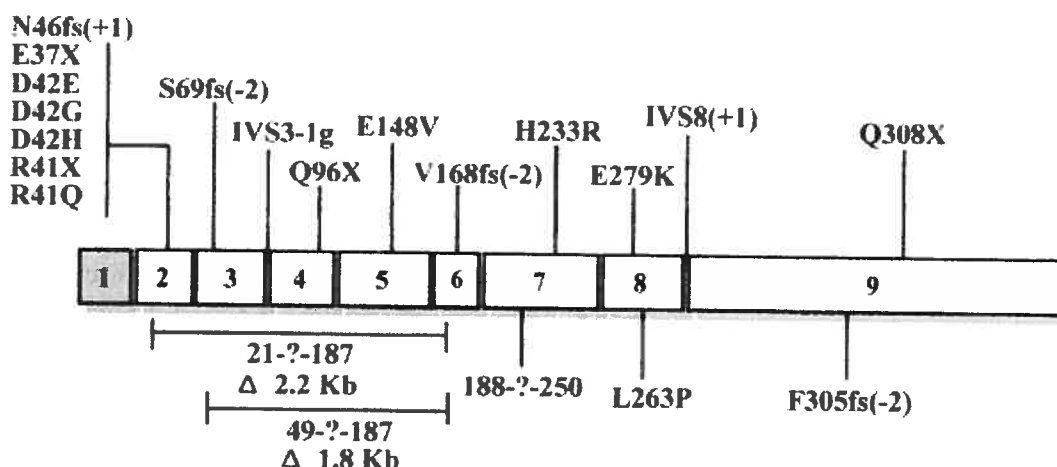


Figure 4: Représentation schématique de mutations présentement identifiées dans le gène HMGCL humain.(Cardoso et al., 2004)

| Number of cases | Mutation | Codon change | Exon/intron | cDNA position | Comments mRNA/protein | Ethnic origin |
|-----------------|------------|---------------------|-------------|-----------------|---|----------------------------|
| 1 | E37X | Glu 37 > stop | E2 | G 109 > T | Partial skipping | Portuguese |
| 1 | | | | | Exon 2/3 | Moroccan |
| 3 | | | | | Truncated protein | Spanish |
| 1 | | | | | | Turkish |
| 2 | N46fs(+1) | Asn 46 > Lys | E2 | 137 ^ 138 ins A | Frameshift/premature stop codon 47 | Italian |
| 6 | R41Q | Arg 41 > Gln | E2 | G122 > A | Missense | Saudi Arabian |
| 1 | | | | | | Turkish |
| 1 | | | | | | Italian (het) |
| 1 | R41X | Arg 41 > stop | E2 | C121 > T | Stop codon | English (het) |
| 1 | D42H | Asp 42 > His | E2 | G124 > C | Missense | Cajun Black (het) |
| 1 | D42G | Asp 42 > Gly | E2 | A125 > G | Missense | German |
| 1 | D42E | Asp 42 > Glu | E2 | T126 > G | Missense | Austrian |
| 1 | 21-?-187 | Val 21del | E2,3,4,5,6 | 61-561del | Deletion between Val21-Glu187 | Turkish |
| 2 | S69fs(-2) | Ser 69 > Cys | E3 | 202-207del CT | Frameshift/premature stop codon 79 | French-Canadian (Quebeque) |
| 1 | 49-?-187 | Asn 49del | E3,4,5,6 | 145-561del | Deletion between Asn49/Glu187 | Italian |
| 1 | IVS3-1g | Asn 49-Gln 84 del | I3 | 252delG | Skipping exon 3 | Japanese |
| 1 | Q96X | Gln 96 > stop | E4 | C286 > T | Stop codon/Truncated protein | Italian |
| 1 | E148V | Gln148-Glu187 del | E5 | A434 > T | Del Gln148-Glu187 Aberrant splicing partial E5 and total E6 | Japanese (het) |
| 1 | V168fs(-2) | Val 168 > Val | E6 | 504-505del CT | Frameshift/premature stop codon 176 | Spanish |
| 2 | H233R | His 233 > Arg | E7 | A698 > G | Loss active catalytic site | English French [het] [s] |
| 1 | 188-?-250 | Val 188-Gln 250 del | E7 | 564-750del | Deletion exon 7 | Japanese |
| 1 | E279K | Gln 279 > Lys | E8 | G835 > A | Missense | Japanese |
| 1 | L263P | Leu 263 > Pro | E8 | T788 > C | Missense | French [het] [s] |
| 1 | IVS8(+1) | | I8 | AGgt > AGtt | Aberrant splicing | Turkish |
| 2 | F305fs(-2) | Phe 305 > Tyr | E9 | 914-915del TT | Premature stop codon | Saudi Arabian |
| 1 | Q308X | Gln 308 > stop | E9 | C922 > T | Stop codon (del 18 amino acids) | Japanese |

Tableau II : Mutations dans le gène HMGCL. (Cardoso et al., 2004).

1.7 Modèles animaux des maladies CASTOR

Des souris ont été modifiées génétiquement afin de servir de modèle dans l'étude des maladies de type CASTOR. Il existe une souris déficiente pour chacune des déshydrogénases responsables de la β -oxydation des acides gras, soit le SCAD, le MCAD, le LCAD et le VLCAD. La souris déficiente en MCAD (Tolwani et al., 2005), déficience la plus commune dans la β -oxydation mitochondriale des acides gras chez l'humain, présente une acidémie organique caractéristique (acides adipiques, subériques et sébaciques ainsi que hexanoylglycine), une stéatose hépatique après un jeûne de 24h et une intolérance au froid suite au jeûne. Les souris déficientes en LCAD (Kurtz et al., 1998) et en VLCAD (Cox et al., 2001) présentent une accumulation sérique et hépatique d'acylcarnitines (C10, C12 et C14) pour la déficience en LCAD et d'acylcarnitines plus longues (C16 et C18) pour la déficience en VLCAD. Il existe des souris qui, naturellement, sont déficientes en SCAD (Amendt et al., 1992): les souris BALB/cByJ. Elles présentent une acidémie organique caractéristique (acides éthylmalonique et méthylsuccinique ainsi que N-butyrylglycine) et, lors d'un jeûne de 18h, vont développer une stéatose hépatique ainsi qu'une hypoglycémie sévère.

Une souris déficiente en CPT1 a été créée, mais celle-ci est caractérisée par une mortalité prénatale (Nyman et al., 2005). Il y a également eu la création d'un modèle animal pour la déficience en LCHAD, cette souris déficiente en MTP (mitochondrial trifunctional protein) décède après les premières 6 à 36 heures de vie (Ibdah et al., 2005). L'hétérozygote âgé de 9 à 10 mois développe une stéatose hépatique et une résistance à l'insuline.

Certaines souris ont été créées dans le but d'étudier l'acidémie propionique, l'acidémie méthylmalonique et l'acidémie glutarique. Une souris déficiente en Propionyl-CoA Carboxylase (acidémie propionique) (Miyazaki et

al., 2001) meurt après 24 à 36 heures de vie. L'utilisation d'un transgène à faible expression permet la viabilité de la souris, mais celle-ci a un phénotype normal. La majorité des souris développe une légère cétonurie alors que quelques unes développeront une stéatose hépatique. La souris déficiente en Methylmalonyl-CoA mutase, décède avant 24h d'âge et ne peut donc pas être utilisée pour l'étude métabolique de l'acidémie méthylmalonique (Peters et al., 2003). Finalement, une souris déficiente en Glutaryl-CoA déshydrogénase a été créée (Koeller et al., 2004). Celle-ci ne développe aucun phénotype clinique ressemblant à l'acidémie glutarique mais une myélinopathie spongiforme progressive, ce qui pourrait en soi être intéressant.

1.8 Expérience du laboratoire dans le domaine du métabolisme énergétique des lipides

Le laboratoire d'accueil a contribué à l'avancement des connaissances dans le domaine du métabolisme énergétique des lipides. Il a été le premier à cloner le gène humain et l'ADNc et à trouver des mutations pour les enzymes mHS, HL et SCOT (Boukaftane and Mitchell, 1997; Fukao et al., 2000; Wang et al., 1996). Le laboratoire a également publié une hypothèse pour expliquer l'évolution de la cétogenèse (Boukaftane et al., 1994). De plus le laboratoire se spécialise dans l'étude des lipases adipocytaires avec ses travaux sur la lipase hormono-sensible (LHS) (Fortier et al., 2004) et la découverte de la carboxylestérase 3 comme lipase (Soni et al., 2004). Le laboratoire a créé une souris déficiente en LHS (Wang et al., 2001).

Le laboratoire d'accueil a également tenté de créer un modèle des maladies CASTOR en générant une souris invalidée de façon constitutive en HL (Wang et al., 1998). Malheureusement, la souris décède *in utero* à 11,5 jours post-coïtum. De plus, l'hétérozygote ne présente aucune différence au niveau du phénotype par rapport à la souris de type sauvage. L'utilisation de cette souris déficiente en HL comme modèle des maladies CASTOR n'est donc pas possible.

Par conséquent, aucun modèle animal actuel ne possède suffisamment de symptômes retrouvés chez les patients en clinique ou survit assez longtemps pour être étudié. La nécessité de créer un modèle animal des maladies CASTOR est encore présente.

1.9 Hypothèse et but du projet

L'hypothèse à la base de ce projet de maîtrise est qu'il est possible de créer un modèle des maladies CASTOR à l'aide d'une souris déficiente de façon hépatospécifique en HL qui servira à l'étude de la physiopathologie.

Le but de ce projet est de créer et d'étudier un modèle des maladies CASTOR afin de mieux en comprendre la physiopathologie.

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériels

Toutes les enzymes utilisées pour les réactions de PCR proviennent d'Invitrogen. L'enzyme utilisée pour le dosage des corps cétoniques et l'albumine provenant du sérum bovin (sans acides gras) ont été obtenues de Roche Diagnostics. La collagénase de Type 1, utilisé pour l'isolement des hépatocytes, provient de la compagnie Worthington. Le $[2-^{14}\text{C}]$ Pyruvate, utilisé dans l'évaluation du flux du cycle de Krebs, provient de Perkin-Elmer. La colonne servant à l'extraction des acyls-CoA provient de la compagnie Waters. Tous les autres produits chimiques proviennent de Sigma, sauf indication contraire.

2.2 Méthodes

2.2.1 Création de la souris

La souris a été créée au laboratoire avant mon arrivée par le Dr Shupe Wang. L'invalidation organospécifique a été réalisée par la technique Cre-Lox. L'organe ciblé dans le cadre de ce mémoire est le foie. L'invalidation hépatospécifique a été effectuée grâce à l'expression d'un transgène Cre par le promoteur de l'albumine sur au moins un allèle. Dans le vecteur, l'exon 2 du gène d'HL est flanqué de 2 sites Lox. L'exon d'HL ciblé pour l'invalidation génique est l'exon 2, cible de plusieurs mutations qui inactivent complètement HL. La structure du vecteur de ciblage est indiquée à la figure 5.

2.2.2 Conditions de l'animalerie

Les conditions de vie des souris HLLKO (HL liver specific KO) sont standards pour l'animalerie du CHU Ste-Justine : de cycles de lumière et d'obscurité de 12 heures entre 6h et 18h, un accès à l'eau ad libidum. Les souris sont nourries avec la diète *Teklad Mouse Breeder* (W) 8626 (Harlan, Madison,

WI). Le génotypage est réalisé à l'aide de l'ADN isolé des queues de souris par PCR à l'aide avec les sondes 5' GAG CAC AGC TTC CTT GCT TA 3', 5' ACA GTC TTG AGC CAC TTG ATA T 3' et 5' ATC CAT CTT GTT CAA TGG CCG ATC C 3' pour le gène d'HL et les sondes 5' GAT GGA CAT GTT CAG GGA TC 3' et 5' AGC TTG CAT GAT CTC CGG TA 3' pour le transgène Cre.

2.2.3 Changement de diète

La diète modifiée pour la survie des souris HLLKO est une diète contenant 6% de protéines (TD 90016 Harlan, Teklad). Cette nourriture est changée régulièrement pour éviter la croissance bactérienne. Autrement elle est gardée réfrigérée. L'eau contient 10% glucose (poids/volume) et est changée à tous les 2 jours pour éviter la croissance de bactéries. L'accès à l'eau glucosée et à la diète faible en protéines est *ad libidum*.

2.2.4 Buvarpage de type Southern

Le buvardage de type Southern a été effectué tel que dans présenté dans Wang et al (1998). Brièvement, 5 µg d'ADN génomique est digéré avec *HindIII* ou *HindIII* et *XbaI*. Ensuite, une électrophorèse sur un gel d'agarose (0,8%) dans du tampon TAE 1×. Les échantillons sont par la suite transférés sur une membrane de nylon (Hybond-N; Amersham). Les sondes utilisées possèdent un fragment amplifié comprenant les résidus 799-1130 de l'intron 1 en amont du site d'épissage accepteur ou l'ADNc de *Neo*. L'hybridation est effectué dans une solution de SSC 4×, de Denhardt 5× (1x Denhardt est du Ficoll, de l'albumine de sérum de bœuf et du polyvinyl pyrrolidone, chacun à une concentration de 0,2 mg/mL), de 10% (w/v) dextran sulfate, de SDS 1% (w/v) et de 100 mg/ml d'ADN de sperme de saumon cisailé. La membrane est par la suite lavée trois fois à 65°C : la première fois dans une solution SSC 2x et SDS 0,5% durant 30 minutes,

la deuxième fois dans une solution SSC 1x et SDS 0,5% pour 30 minutes et la troisième fois dans une solution SSC 0,5x et SDS 0,5% pour 20 minutes.

2.2.5 Buvardage de type Northern

Le buvardage de type Northern a été effectué conformément à Mitchell et al (1993).

2.2.6 Immunobuvardage de type Western

L'immunobuvardage de type Western ainsi que l'anticorps anti-HL a été réalisé tel que décrit dans Ashmarina et al (1994).

2.2.7 Dosage de l'activité d'HL

Le dosage d'HL a été effectué tel que décrit dans Wang et al (1998). Brièvement, la fraction étudiée est placée en présence d'HMG-CoA comme substrat. Une incubation de 30 minutes à 37°C permet la production de l'AcAc. La réaction est arrêtée par une précipitation à l'acide perchlorique suivi d'une neutralisation par une solution basique (2M KOH et 0,3M Mops). L'AcAc produit est par la suite dosé spectrophotométriquement grâce à la réaction suivante :



En ajoutant l'enzyme 3HBDH et un excès de NADH qui est visible à 340nm, il est possible de déterminer la quantité d'AcAc présent en fonction de la quantité de NADH utilisée. Les protéines ont été dosées tel que décrit avec de l'albumine de bœuf fœtal comme standard (Bradford, 1976).

2.2.8 Isolement des hépatocytes

La technique d'isolement des hépatocytes a été adaptée de Seglen (1976). Nous avons adapté la technique pour la souris; les étapes sont décrites dans la

section Résultats. La suite présente le protocole final. Brièvement, la souris est anesthésiée au Somnotol. Ensuite, la veine porte est canulée à l'aide d'un cathéter 24G 3/4". Le cathéter est relié au tuyau de la pompe afin de commencer la perfusion. Dès le début de la perfusion, la veine cave est sectionnée à la sortie du foie afin de permettre au tampon de s'écouler et éviter une surpression dans le tissu. Deux tampons sont utilisés pour réaliser la perfusion. Le premier, le tampon de lavage, contient du NaCl (136,9 mM), du KCl (2,68 mM), de l'Hepes (10 mM) et du Na_2HPO_4 (0,28 mM) dans un volume final d'un litre à un pH de 7,65. Le deuxième, le tampon de digestion, est constitué du tampon de lavage à lequel est ajouté 0,33 mg/mL de collagénase (Type 1 Worthington) et 1 mg/mL de CaCl_2 pour un volume final de 75mL. La perfusion s'effectue à un débit de 7mL/min et les tampons doivent être maintenus à 37°C. La première étape de la perfusion, avec le tampon de lavage, dure 4 minutes. Par la suite, le tampon de digestion, est perfusé pour environ 7-8 minutes. Le foie est par la suite retiré et sa vésicule biliaire enlevée. Sa membrane extérieure est brisée et les hépatocytes sont recueillis dans un pétri contenant du milieu de culture L-15 contenant 0,2% albumine. Le tout est filtré par une membrane de nylon de 74 μm . Les hépatocytes sont ensuite centrifugés trois fois à 50xg durant 2 minutes à 4°C. Suite à la dernière centrifugation, les hépatocytes sont ressuspendus dans le tampon voulu pour la culture et la viabilité est testée à l'aide du test d'exclusion au bleu de Trypan. Celui-ci consiste à mélanger 25 μL de bleu de Trypan (0,2% dans PBS) avec 50 μL de la solution de culture cellulaire et laisser incuber 10 minutes. Par la suite, le décompte de cellules vivantes est effectué, un minimum de 75% est nécessaire pour l'utilisation des cellules. Les cellules n'excluant pas le colorant ont une intégrité membranaire endommagée et sont considérés mortes.

2.2.9 Dosage de la cétogénèse

Le dosage de l'activité cétogénique est effectué sur des hépatocytes en culture primaire. Ceux-ci sont placés en présence de différentes concentrations d'octanoate, un acide gras à chaîne moyenne. Les hépatocytes sont ainsi incubés durant 30 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par une précipitation à l'acide

perchlorique. La solution est neutralisée par une solution de 2M KOH et 0,3M Mops. L'AcAc produit est dosé par spectrophotométrie tel que décrit dans le dosage de l'activité d'HL.

2.2.10 Dosage du flux du cycle de Krebs

Le dosage du flux du cycle de Krebs a été effectué tel que décrit dans Kelleher et Bryan (1985). Brièvement, des mitochondries sont incubées en présence de [2- ^{14}C]Pyruvate (8Ci/mol), d'ATP (1mM) et d'hexokinase (1U/mL). L'incubation est effectuée durant 30 minutes à 30°C dans un Erlenmeyer scellé possédant une cupule suspendue. La réaction est stoppée avec l'injection de 0.3 mL de HClO_4 20%. Le $^{14}\text{CO}_2$, produit par le cycle de Krebs, est trappé à l'aide de 0.3 mL de methylbenzonium hydroxide injecté dans la cupule suspendue. L'absorption est d'une durée de 2 heures. Le methylbenzonium hydroxide chargé du $^{14}\text{CO}_2$ est par la suite dosé par un compteur à scintillation. Une préincubation de 30 minutes à 30°C avec différentes concentrations d'acide alpha-kétoisocaproïque (α -KIC) peut être effectuée tel que précisé dans la section "Résultats".

2.2.11 Polarimétrie

Les essais de polarimétrie ont été effectués selon la technique présentée dans Trounce et al (1996). Les calculs ont également été réalisés tel que décrit dans l'article.

2.2.12 Extraction des acyls-CoA pour l'analyse par spectrométrie de masse

Nous avons testé différentes techniques d'extraction et de préparation pour la spectrométrie de masse des dérivés acyls-CoA. Elles sont décrites dans la section "Résultats". Dans cette section, est brièvement résumée la technique

utilisée pour générer les résultats présentés (figures 15 et 16). La préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse a été effectuée tel que décrit dans Minkler et al (2006). Pour ce faire, le foie est rapidement prélevé pour être ensuite pulvérisé sous azote liquide dans un mortier-pilon. Environ 0,1 et 0,2 g de foie en poudre est homogénéisé dans 1mL d'acide trichloroacétique 10%. L'homogénat est vortexé et centrifugé 5 minutes à 13 000xg. Le surnageant est appliqué sur une colonne (solid-phase extraction column Waters Oasis HBL 1cc, preconditionné avec 1mL de méthanol suivi de 1 mL d'eau). La colonne est ensuite lavée avec 1 mL d'eau. Les acyls-CoA sont élués avec 1 mL de méthanol. L'éluât est évaporé sous azote. L'échantillon en poudre est par la suite donné au groupe du Dr Orval Mamer (Université McGill) pour l'analyse par spectrométrie de masse.

2.2.13 Dosages métaboliques

La glycémie est mesurée à l'aide du glucomètre Precision Q.I.D. (Medisense, Abbott laboratories, Mississauga, Ontario)

Le dosage des métabolites sanguins (ammoniaque, AST, ALT) a été réalisé par le laboratoire de biochimie clinique du CHU-Ste-Justine à l'aide de l'autoanalyseur clinique.

2.2.14 Acides organiques

Les acides organiques présents dans l'urine des souris HLLKO ont été analysés par l'équipe du Dr Orval Mamer en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). L'urine des souris a été récoltée grâce à l'utilisation de cage métabolique. Les souris avaient accès à la diète et à l'eau *ad libidum* durant toute la durée du prélèvement qui a duré 4 jours. La souris doit conserver un bon état clinique tout au long du prélèvement. L'urine était collectée une fois par jour à 10h pour ensuite être congelée à -20°C.

2.3 Rôle du candidat

Lors de cette étude collaborative qui implique plusieurs chercheurs, mon rôle exact a été le suivant. J'ai été responsable de la gestion de toutes les souris HL -/-, soit les croisements, le génotypage, la prescription du changement de diète, les études de cohorte et le sevrage. J'ai mis au point et effectué la technique d'isolement des hépatocytes. L'utilisation des souris et l'application de la technique m'ont permis de caractériser le modèle. J'ai effectué les buvardages Southern et Northern, l'immunobuvardage de type Western et le dosage enzymatique d'HL. J'ai mis au point le dosage de voies métaboliques (cétogenèse, polarimétrie, cycle de Krebs, néoglucogenèse et uréagenèse).

J'ai raffiné le protocole d'extraction des acyls-CoA, pour ensuite préparer les échantillons pour les analyses en spectrométrie de masse. À partir de ce moment, les travaux ont été entièrement réalisés par l'équipe du Dr Mamer.

Je n'ai pas effectué les analyses par analyse RMN mais ceux-ci sont présentés car ils sont pertinents à l'interprétation de mes résultats.

J'ai réalisé l'ensemble des travaux effectués sur la souris HLLKO à l'exception des études par RMN et spectrométrie de masse. Il est à noter qu'une mortalité accrue des souris HLLKO, a limité la quantité de souris disponibles pour effectuer mes travaux de maîtrise.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1 Validation de l'efficacité du ciblage génique

Afin d'obtenir une souris invalidée de façon organospécifique, nous avons utilisé la technique Cre-Lox (voir figure 5). Une séquence Lox a été ajoutée en amont et en aval de l'exon 2 du gène d'HL. L'orientation des deux séquences Lox va permettre une excision de la séquence située entre elles, ici l'exon 2 d'HL, lorsque le transgène Cre sera exprimé. Un gène de résistance à la néomycine a été ajouté afin de suivre le vecteur. Les différents fragments générés par la digestion double par les enzymes de restriction *HindIII* et *XbaI* permettront d'identifier les différentes mutations possibles du vecteur. Le transgène Cre a été couplé au promoteur hépatospécifique de l'albumine afin de permettre une invalidation uniquement au niveau des hépatocytes. L'utilisation du transgène Cre couplé à un promoteur spécifique à un autre type cellulaire permettra d'étudier l'invalidation dans un autre organe.

Le buvardage de type Southern a été réalisé à partir d'homogénats de foie de souris normales, homozygotes pour le vecteur contenant les séquences Lox mais dont le transgène Cre n'est pas présent et des souris homozygotes pour le vecteur Lox et possédant le transgène Cre. Les résultats présentés sur la figure 6 montrent le fragment détecté chez la souris normale est de 3,3 Kb. La longueur du fragment représente la section du gène d'HL comprenant l'exon 2 et 3, située entre les sites des enzymes de restriction *HindIII* et *XbaI*. Chez les souris homozygotes pour l'allèle modifié mais non excisé, le fragment détecté est de 4,3Kb. Il s'agit du même fragment que celui détecté chez la souris normale auquel a été introduit 2 séquences Lox de part et d'autre de l'exon 2 et un gène de résistance à l'antibiotique Neomycine. Chez la souris invalidée en HL, homozygote pour l'allèle modifié et exprimant le transgène Cre à partir du promoteur de l'albumine, deux fragments sont détectés soit de 3,0Kb et de 4,3Kb, ce dernier étant plus faiblement présent. La bande de 4,3Kb est la même que celle décrite ci-haut. La bande de 3,0Kb correspond au fragment résultant de la circularisation et le retrait de l'ADN contenu entre les deux séquences Lox

suite à l'expression du transgène Cre. Lors de la circularisation, une séquence Lox, le gène de résistance à la néomycine et une séquence d'ADN contenant l'exon 2 sont excisés. Une seule séquence Lox demeure présente dans le fragment, pour une longueur finale de 3,0Kb.

Le buvardage de type Northern a été réalisé avec de l'ARN isolé à partir d'homogénats de foie de souris normales et invalidées en HL. Les résultats sont présentés dans la figure 7. L'ARN messager d'HL est détecté chez la souris normale. Un ARN messager est également détecté chez la souris invalidée en HL, mais il est plus court que celui de la souris normale.

L'immunobuvardage de type Western a été réalisé à partir de mitochondries isolées à partir de foie de souris normales et invalidées en HL. La figure 8 montre qu'HL a été détectée dans l'échantillon de la souris normale à une taille normale de 32 kDa. Dans les échantillons provenant de 3 différentes souris invalidées en HL, l'HL n'est pas détectable.

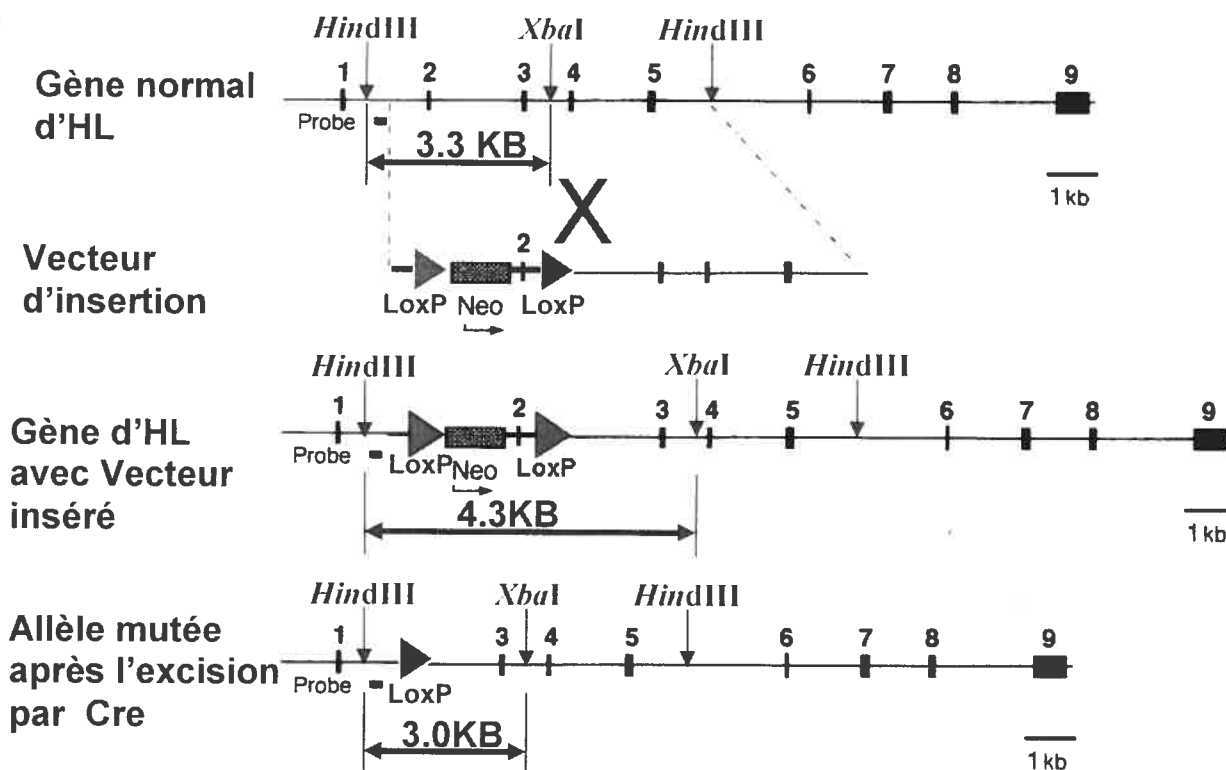


Figure 5: Vecteurs du ciblage génique conditionnel pour l'exon 2 d'HL. Dans nos expériences nous avons créé les souris homozygotes pour l'allèle HL ciblé avec au moins un allèle à partir duquel la recombinaise Cre est exprimée à partir du promoteur de l'albumine afin d'obtenir une spécificité au niveau des hépatocytes.

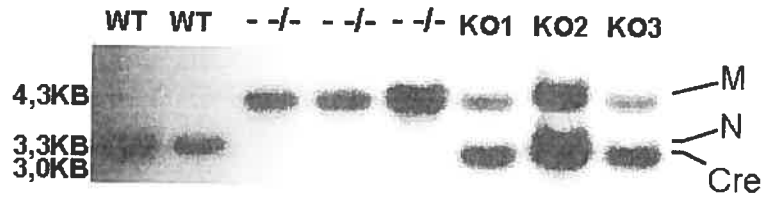


Figure 6 : Buvarpage de type Southern d'extraits de foie de souris de différents génotypes. Dans la figure, **WT** représente des souris avec un génotype normal. Les colonnes **-/-** représentent des souris homozygotes pour l'allèle HL ciblé et où l'allèle à partir duquel la recombinaise Cre est exprimé est absent. **KO** représente les souris homozygotes pour l'allèle HL ciblé avec au moins un allèle à partir duquel la recombinaise Cre est exprimée. **M** représente le fragment muté; **N**, le fragment normal alors que **Cre** indique le fragment généré lors de l'excision par la recombinaise Cre.

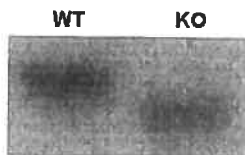


Figure 7 : Buvarpage de type Northern d'ARN extraits de foie de souris normale et invalidé en HL. Dans la figure, **WT** représente des souris avec un génotype normal. **KO** représente les souris homozygotes pour l'allèle HL ciblé avec au moins un allèle à partir duquel la recombinaise Cre est exprimée.

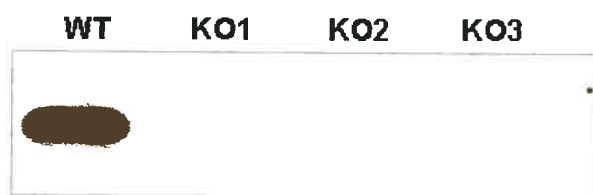


Figure 8 : Immunobuvardage de type Western sur la protéine HL effectué à partir d'extraits mitochondriaux de foie de souris normale et invalidées en HL.

Dans la figure, **WT** représente des souris avec un génotype normal. **KO** représente les souris homozygotes pour l'allèle HL ciblé avec au moins un allèle à partir duquel la recombinaison Cre est exprimée (1-2-3 représentant 3 différentes souris).

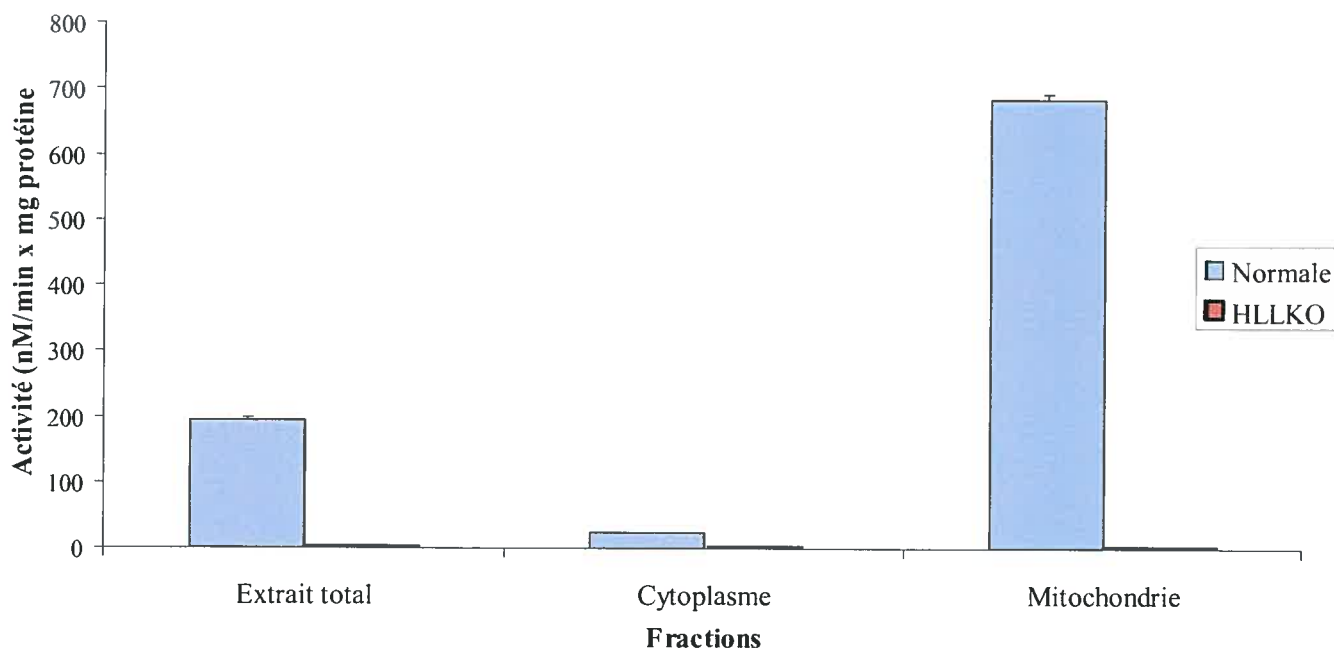


Figure 9 : Activité enzymatique d'HL de différentes fractions de foie de souris normales et invalidées en HL. Mesures : moyennes \pm SEM, n=3

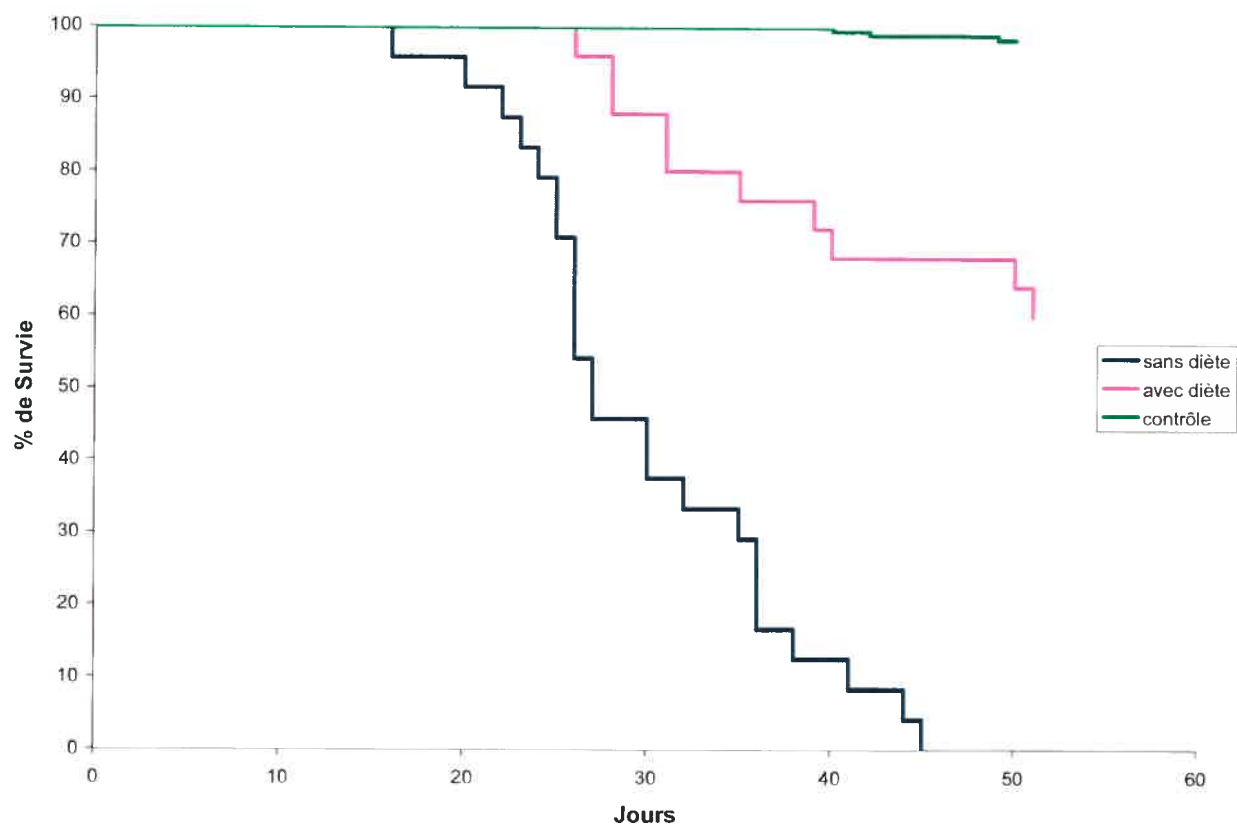


Figure 10 : Courbes de survie de type Kaplan-Meier des souris HLLKO avec et sans modification de diète en comparaison avec un groupe contrôle. Sans Diète $n = 24$, avec diète $n = 25$, contrôle $n = 25$.

3.2 Phénotype clinique

Afin de confirmer l'invalidation au niveau enzymatique, j'ai dosé l'activité enzymatique d'HL. Elle a été évaluée sur l'extrait total de l'homogénat de foie, sur la fraction cytoplasmique et sur la fraction mitochondriale. Comme le montrent les résultats présentés dans la figure 9, dans les trois fractions, l'activité d'HL est négligeable chez la souris HLLKO en comparaison avec celle mesurée chez la souris normale.

3.3 Modifications effectuées afin d'obtenir un modèle adéquat pour les études métaboliques

Les souris HLLKO (*HL liver specific KO*) sont viables à la naissance, mais l'ensemble de la cohorte décède entre 3 et 5 semaines de vie sous des conditions de vie et de diète standard de l'animalerie, tel que démontré dans la figure 10. Le décès survient à la suite d'une décompensation rapide et imprévisible. Cette décompensation est caractérisée par une léthargie, une hypoglycémie sévère et une stéatose hépatique sévère. Afin d'augmenter la viabilité de la cohorte, j'ai modifié la diète. Pour diminuer le débit de la cétogenèse à partir de la leucine, j'ai diminué l'apport protéique dans la diète, passant de 20% à 6%. Dans la même optique, j'ai ajouté un apport glucidique dans l'eau de boisson (10% glucose) afin d'éviter les périodes de jeûne. Il est à noter que les souris mangent surtout la nuit, durant la noirceur, mais boivent au cours de la journée. La souris est soumise à un cycle de 12 heures lumière/noirceur, ce qui représente une période de jeûne prolongée pour la souris durant le jour. L'ajout de glucose dans l'eau permet de contourner ce problème. Les souris sont exposées à cette diète à partir de l'âge de 2 semaines, soit avant le sevrage. La technique de sevrage a également été modifiée. Les petits sont laissés plus longtemps avec la mère afin de rendre la transition plus tolérable. Les petits sont sevrés vers 4 semaines au lieu de 3 semaines afin qu'ils possèdent un poids plus élevé, une meilleure facilité à manger la nourriture solide et probablement plus de réserves de glycogène pour diminuer le recours aux acides gras et aux

acides aminés lors des périodes de jeûne physiologique. Ces changements ont amélioré la viabilité des souris HLLKO, jusqu'à plus de 7 mois dans certains cas. Malgré tout, la mortalité est toujours plus grande chez ces souris HLLKO que les autres génotypes de la cohorte (FIGURE 10).

| Acide organique | Origine | Souris | | Homme | |
|------------------------------|---------|--------|-------|---------|-----------------|
| | | Normal | HLLKO | Normal | Déficient en HL |
| Lactique | K | 51 | 641 | 30-70 | |
| 3-Hydroxybutyrique | C | 9 | 18 | 10-50 | |
| 3-Hydroxyisobutyrique | L | 8 | 41 | 1-5 | |
| 3-Hydroxyisovalérique | L | - | 92 | 5-25 | 60-4170 |
| Succinique | K | 35 | 1227 | 5-20 | |
| Fumarique | K | - | 282 | <2 | |
| 3-Méthylglutaconique | L | - | 2508 | <2 | 260-5160 |
| 3-Hydroxy-3-méthylglutarique | L | 18 | 401 | <2 | 290-5730 |
| 2-Oxoglutarique | K | 2 | 419 | N-Détec | |
| N-Isovalérylglycine | L | 15 | 105 | N-Dispo | |
| 3-Méthylcrotonylglycine | L | - | 598 | N-Dispo | |

Tableau III: Concentrations d'acides organiques (mg/g créatinine) dans l'urine de souris HLLKO et contrôle et valeurs de référence chez l'homme. L'origine des métabolites est identifiée, L, pour les dérivés de la leucine; C pour les intermédiaires de la cétogenèse; K, pour les intermédiaires du cycle de Krebs, c'est à dire un métabolite qui s'accumule dans le ralentissement du cycle de Krebs, de la chaîne respiratoire ou dans l'anoxie. Les valeurs données pour la déficience humaine en HL proviennent de Sweetman (2001). Les résultats ont été obtenus à partir de 1 urine par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (laboratoire du Dr O.Mamer, Université McGill).

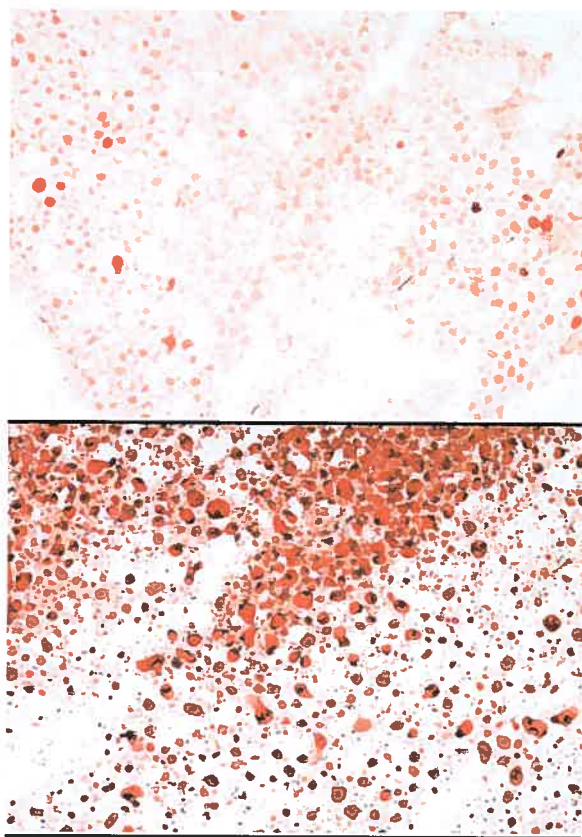


Figure 11: Coupes histologiques de foie de souris colorées à l'huile rouge. Le panneau supérieur représente une section de foie normal, l'inférieur une section de foie de souris HLLKO.

3.4 Observations biochimiques

Le tableau III montre le profil des acides organiques retrouvés dans l'urine des souris HLLKO en comparaison avec les valeurs détectées chez la souris contrôle. À titre de référence, les valeurs retrouvées chez l'humain sont également présentées. Plusieurs acides organiques sont présents en forte concentration dans l'urine des souris HLLKO. Les différents acides organiques peuvent être séparés en 2 groupes selon leur origine. Le premier groupe est composé de l'acide 3-hydroxysiovalérique, de l'acide 3-méthylglutaconique, de l'acide 3-hydroxy-3-méthylglutarique, de l'acide N-isovalérylglycine et de l'acide 3-méthylcrotonylglycine. Il s'agit de composés reliés au catabolisme de la leucine. Le deuxième groupe comprend l'acide fumarique, l'acide succinique, l'acide 2-ketoglutarique et l'acide lactique. Ces acides organiques sont des métabolites du cycle de Krebs plus le lactate qui est immédiatement en amont du cycle de Krebs. Leur accumulation laisse croire à un blocage du cycle de Krebs et/ou de la chaîne respiratoire mitochondriale.

La figure 11 montre une accumulation modérée à sévère de lipides neutres dans la section de foie HLLKO en comparaison avec le foie normal. Ce résultat appuie les observations de stéatose hépatique macroscopique remarquées lors des sacrifices.

L'injection intra-péritonéale de 2 mg/g de poids corporel d' α -KIC, provoque en moins de 30 minutes une décompensation chez la souris HLLKO tandis qu'elle est bien tolérée par la souris normale. Cette décompensation est caractérisée par une léthargie et par une hypoglycémie sévère ainsi qu'une hyperammoniémie en moyenne, 260 μ M chez la souris HLLKO vs 75 μ M chez la souris contrôle, lorsque l'hypoglycémie est contrôlée par des injections i.p. de glucose.

3.5 Isolement et évaluation de la qualité des hépatocytes

Afin de pouvoir utiliser la souris comme modèle cellulaire d'étude de la déficience en HL, j'ai mis au point la technique d'isolement d'hépatocytes. Pour optimiser le rendement d'obtention de cellules vivantes pour la culture primaire, j'ai ajusté la technique de Seglen (1976) qui a été mise au point pour le rat. Les paramètres que j'ai ajustés pour l'adapter aux souris HLLKO, sont les temps de perfusion, la vitesse de la pompe à perfusion, la concentration de collagénase et la vitesse de centrifugation des hépatocytes. Ces modifications m'ont permis d'obtenir une viabilité de plus de 75% de façon reproductible, selon le test d'exclusion au bleu de trypan tel que présenté à la figure 12. J'ai pu ainsi isoler des hépatocytes et les utiliser en culture primaire.

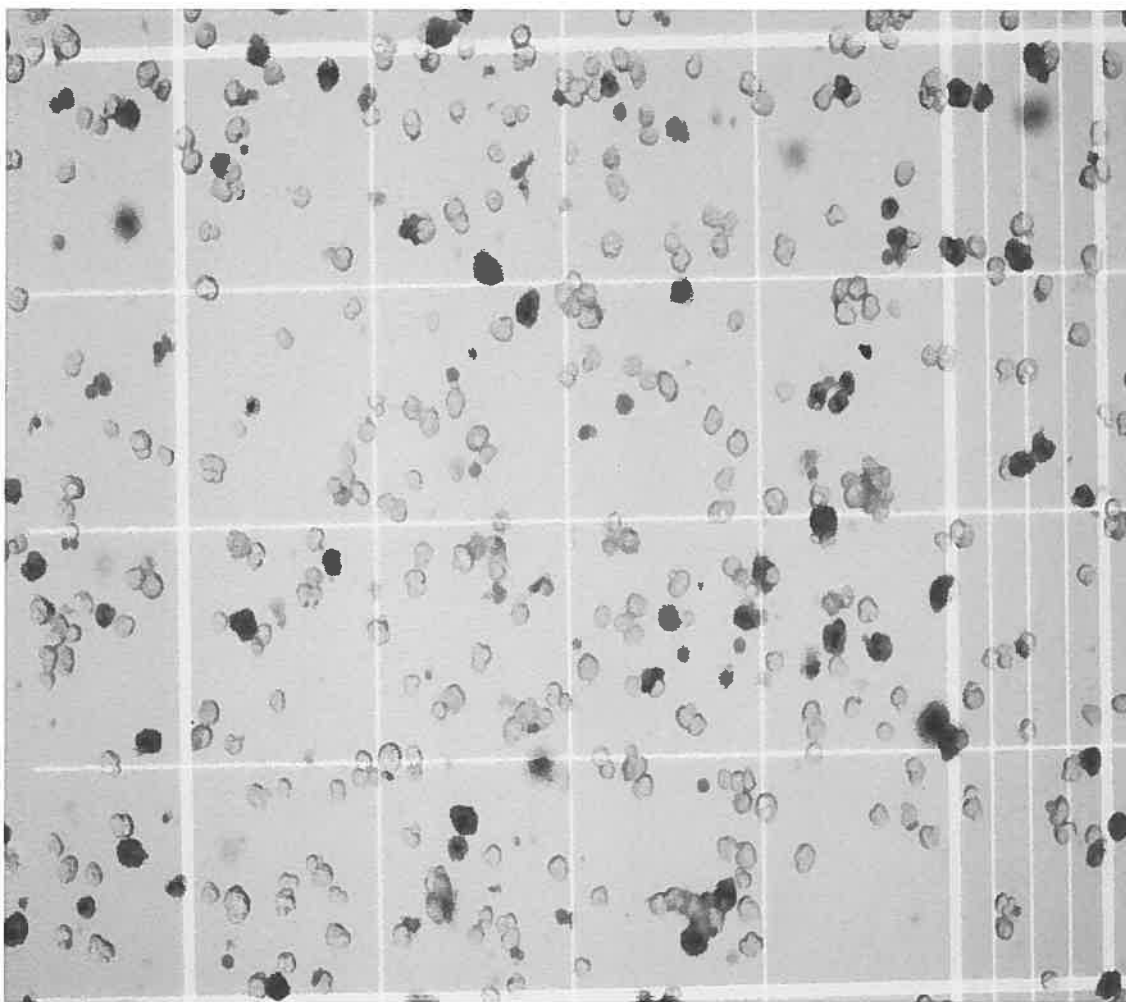


Figure 12: Hépatocytes, isolés par la technique de perfusion à la collagénase en 2 étapes, colorés au bleu de Trypan. Sur cette plaque microscopique, la viabilité cellulaire excède 75%.

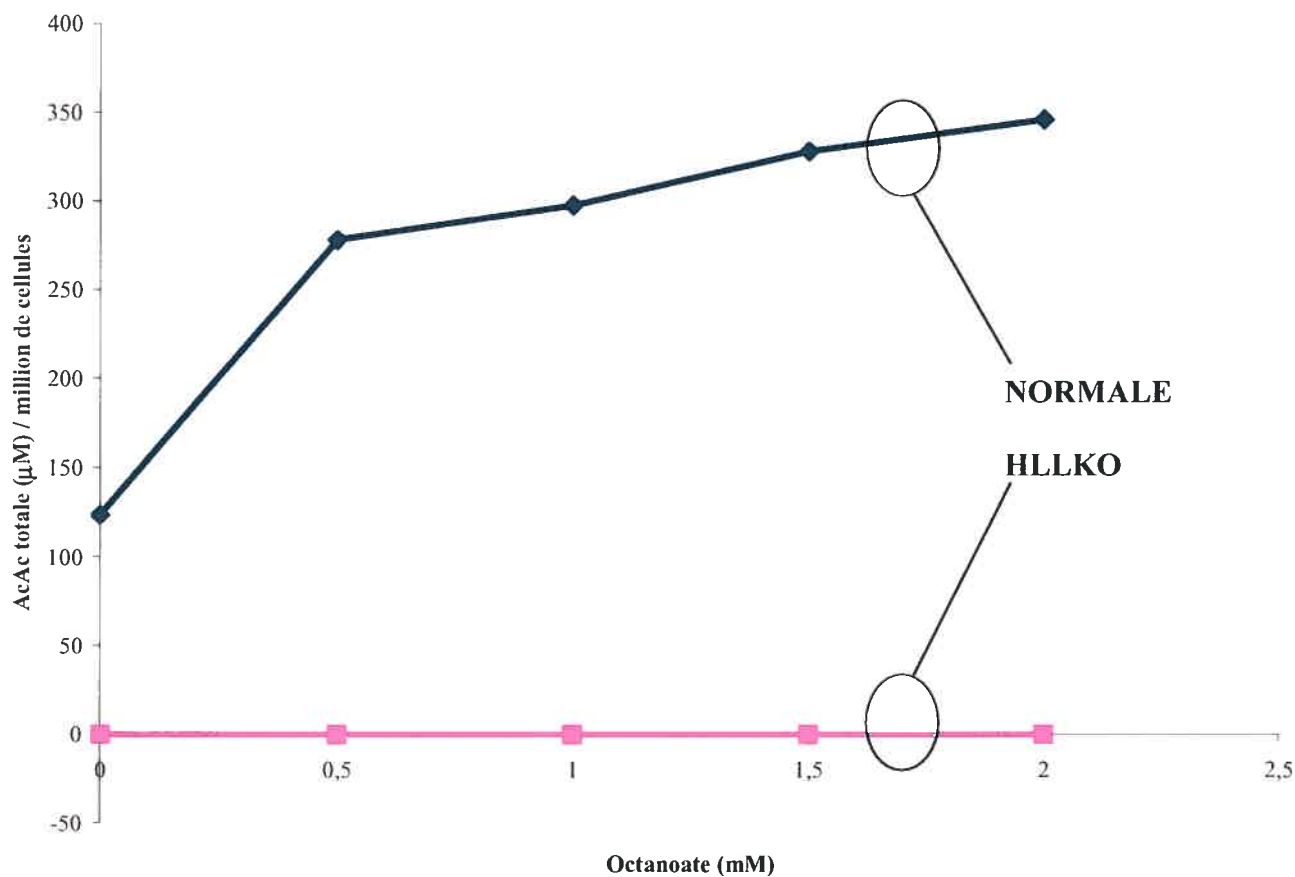


Figure 13: Effet de la concentration d'octanoate sur la cétogenèse dans les hépatocytes isolés à partir de souris normales ou invalidées en HL. Le dosage de l'acétoacétate total produit est rapporté par million de cellules lors d'une incubation de 30 minutes à 37°C, n=1.

3.6 Évaluation de l'activité de la cétogenèse

Dans les hépatocytes isolés de souris normales et HLLKO, j'ai dosé l'activité cétogénique (figure 13). Pour ce faire, j'ai testé différentes concentrations d'octanoate, un acide gras à chaîne moyenne, durant une incubation de 30 minutes à 37°C. La quantité d'acétoacétate générée représente l'activité de la voie métabolique. Dans les hépatocytes normaux, la quantité de corps cétoniques produits augmente avec la concentration d'octanoate et semble atteindre un plateau. Aucune production significative n'a été détectée dans les cellules isolées de souris HLLKO, montrant donc que la voie de la cétogenèse est inactive en absence d'HL. Il n'existe aucune voie hépatique alternative à la réaction catalysée par l'enzyme HL pour la production de corps cétoniques. Nous prévoyons que l'absence de cette voie engendrera des changements métaboliques secondaires. La suite du travail consiste à définir ces changements et évaluer leurs effets.

3.7 Chaîne respiratoire mitochondriale

Étant donné la présence importante d'acide lactique dans l'urine des souris HLLKO (tableau III), compatible avec un défaut de la chaîne respiratoire, j'ai dosé l'activité de cette dernière par polarimétrie. Les résultats présentés dans le tableau IV montrent que la qualité de la préparation est bonne (Respiratory control ratio (RCR) > 4) et qu'il n'y a aucune différence significative dans la capacité maximale de la chaîne respiratoire des mitochondries isolées de foie des souris HLLKO en comparaison avec celles des souris normales. Ces observations n'expliquent donc pas l'accumulation d'acides organiques liée au métabolisme énergétique dans l'urine des souris HLLKO. La prochaine étape est la mesure du flux du cycle de Krebs chez les souris HLLKO lors de la décompensation induite par l' α -KIC.

3.8 Cycle de Krebs

L'activité du cycle de Krebs dans les hépatocytes isolés des souris HLLKO a été évaluée en utilisant du [2- ^{14}C]Pyruvate comme substrat et en dosant la quantité de $^{14}\text{CO}_2$ produit. Afin d'évaluer l'activité du cycle de Krebs en condition extrême, les hépatocytes ont été pré-incubés durant 30 minutes avec différentes concentrations d' α -KIC afin d'obtenir une condition qui ressemble à la décompensation chez les souris HLLKO. Les résultats montrent une diminution du flux du cycle de Krebs dans les hépatocytes déficients en HL lors de l'ajout de 2 et 4 mM d' α -KIC en comparaison avec une augmentation de l'activité dans les hépatocytes normaux lors de concentrations croissantes d' α -KIC.

| Préincubation en presence d'α-KIC | Ajout d'α-KIC | | État 3 | RCR | ADP/O |
|--------------------------------------|------------------|---------|--------|------|-------|
| Aucune | Aucun | Normale | 156 | 4,38 | 2,33 |
| Aucune | 2mM | Normale | 120 | 4,24 | 3,00 |
| | | HLLKO | 102 | 4,33 | 3,07 |
| 20 minutes | 2mM | Normale | 85 | 4,02 | 3,30 |
| | | HLLKO | 113 | 4,34 | 2,42 |
| 37 minutes | 20mM | Normale | 35 | 1,53 | 1,99 |
| | | HLLKO | 72 | 2,83 | 3,33 |
| Valeurs littérature (rat) | | Normale | 62 | 3.68 | 1.96 |

Tableau IV: Dosage de l'activité de la chaîne respiratoire dans les mitochondries isolées de foie de souris HLLKO et normales. La respiration à l'état 3 est exprimée en natoms O / min / mg protéine. Duplicata faite sur 1 souris normale et 1 souris HLLKO. Les valeurs de la littérature proviennent de Oliveira et al (2006)

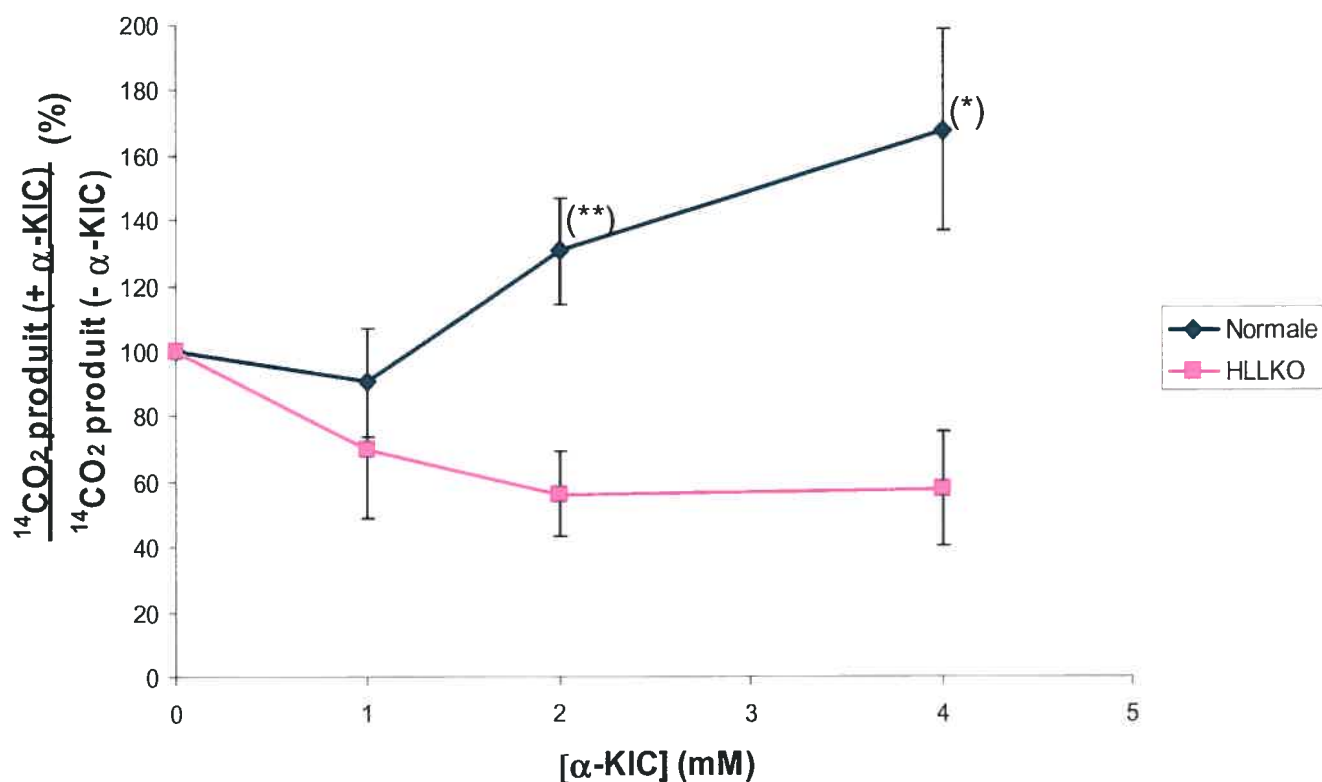


Figure 14: Effets de la concentration d' α -KIC sur la production de $^{14}\text{CO}_2$ à partir de $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ pyruvate par les hépatocytes isolés de souris normales et HLLKO. Les résultats sont exprimés en rapport (%) avec la condition sans α -KIC et sont des moyennes \pm SEM de 5 expériences pour 2 souris différentes. * : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$ HLLKO vs Normale

3.9 Dosage des acyls-CoA par spectrométrie de masse (résultats obtenus en collaboration avec le Dr. O. Mamer)

La figure 15a présente le spectre du Glutaryl-CoA (G-CoA). Il montre un pic à un m/z 880, représentant l'ion moléculaire $[M-H]^-$. Le spectre de décomposition induite par la collision (DIC) de l'ion parent m/z 880 (figure 15b) montre un ion à m/z 533 (fragment incluant la partie glutaryl) de même que les ions à m/z 426 et 408 qui sont dérivés et caractéristiques du noyau CoA.

La figure 15c présente le spectre en scan de l'HMG-CoA. L'ion moléculaire $[M-H]^-$, est présent à m/z 910 (soit 30Da, addition d'un groupement CH_2O , à la masse du G-CoA). Le spectre de DIC (figure 15d) de l'ion m/z 911 montre un fragment à m/z 563 qui inclut la partie HMG, soit également une différence de 30 Da par rapport à l'analyse du spectre DIC de G-CoA. Les fragments caractéristiques du noyau CoA aux m/z de 426 et 408 sont également présents.

Les dérivés CoA détectés dans les échantillons de souris HLLKO sont l'HMG-CoA, le 3-méthylglutaconyl-CoA, le succinyl-CoA et le 3-hydroxyisovaleryl-CoA. Ces deux derniers composés possèdent la même masse de m/z 868 (en mode positif) et 866 (en mode négatif) (figure 16a,b). Leur masse ne diffère que par 36 milliDa. Toutefois, il est possible de les différencier avec le spectromètre de masse à transformation Fournier (FTMS), grâce à sa grande résolution. Les essais en mode négatif ont permis de valider les résultats obtenus en mode positif. L'HMG-CoA et le 3-méthylglutaconyl-CoA ont été détectés respectivement à m/z 912 et 894 en mode positif et à m/z 910 et 892 en mode négatif. Les échantillons de foie ont été préparés à l'aide d'une colonne de purification en phase inverse tel que décrit dans la section "Matériels et Méthodes".

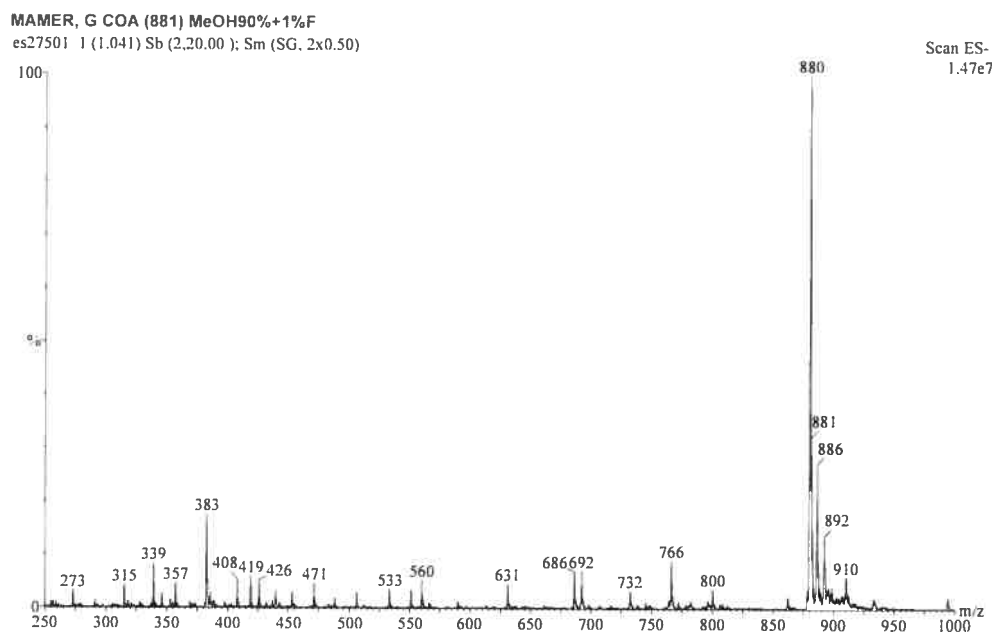


Figure 15a: Spectre en scan du glutaryl-CoA pur analysé par spectrométrie de masse en injection électronique et détection en mode négatif (*negative ion electrospray*).

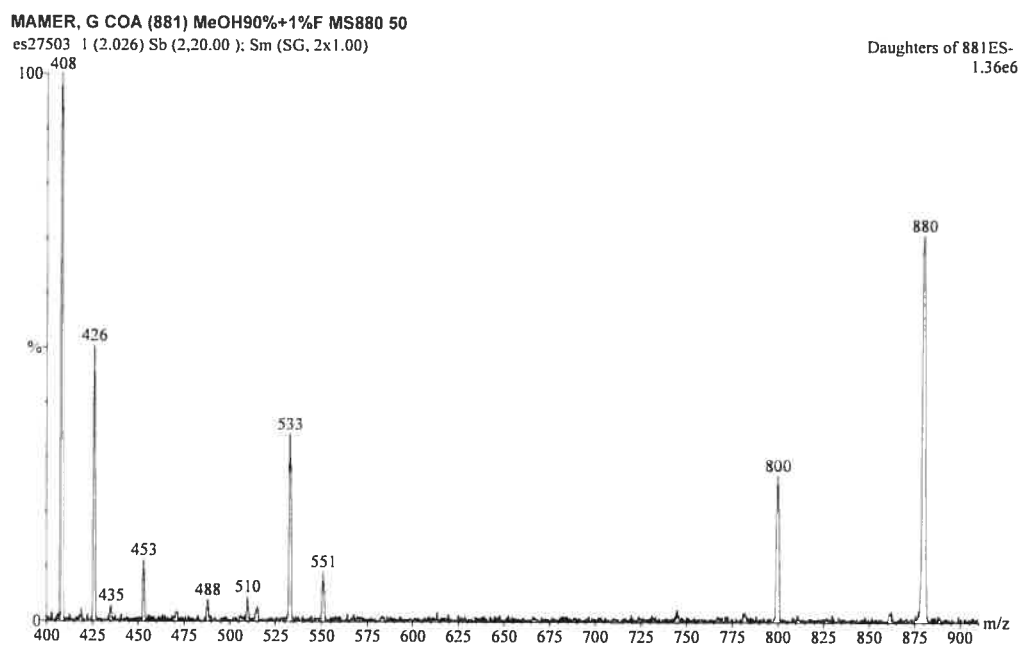


Figure 15b: Spectre du glutaryl-CoA pur obtenu après décomposition induite par collision dans un spectromètre de masse à triple quadrupoles (*negative ion electrospray*).

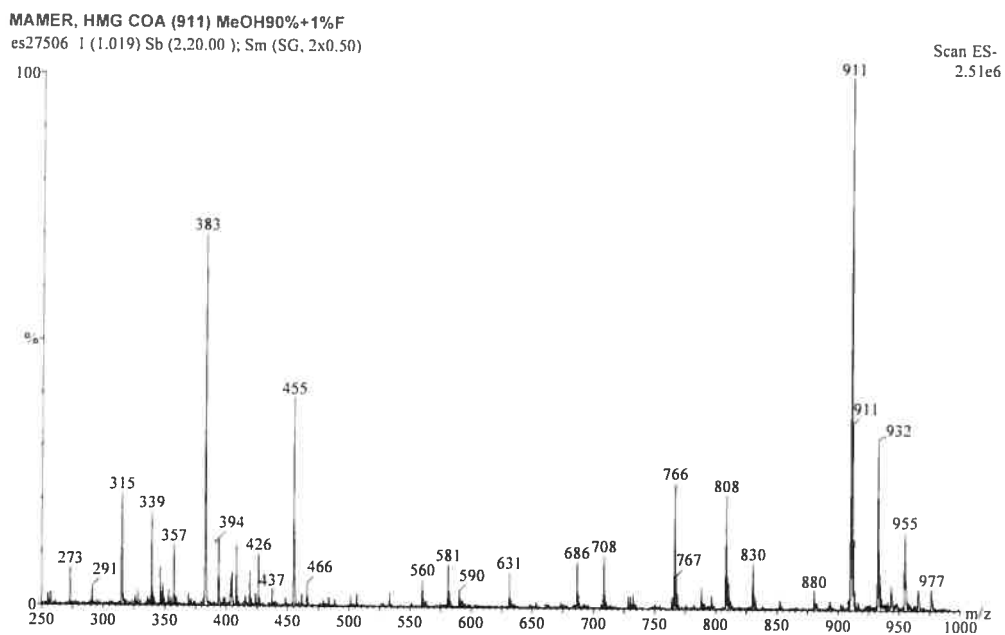


Figure 15c: Spectre en scan du HMG-CoA pur analysé par spectrométrie de masse en injection électronique et détection en mode négatif (*negative ion electrospray*).

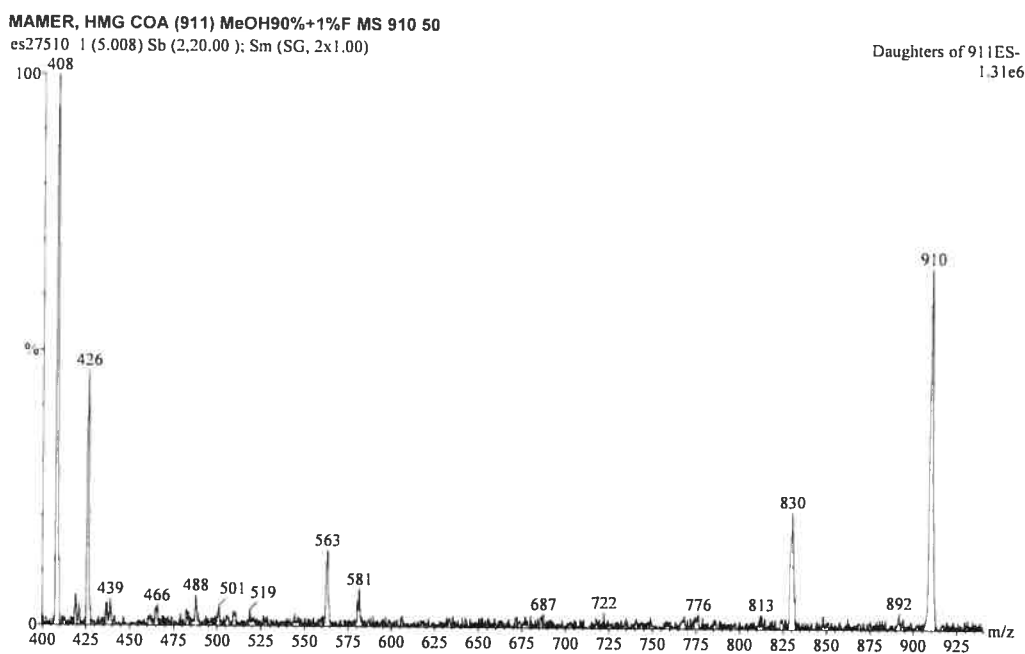


Figure 15d: Spectre du HMG-CoA pur obtenu après décomposition induite par collision dans un spectromètre de masse à triple quadrupoles (*negative ion electrospray*).

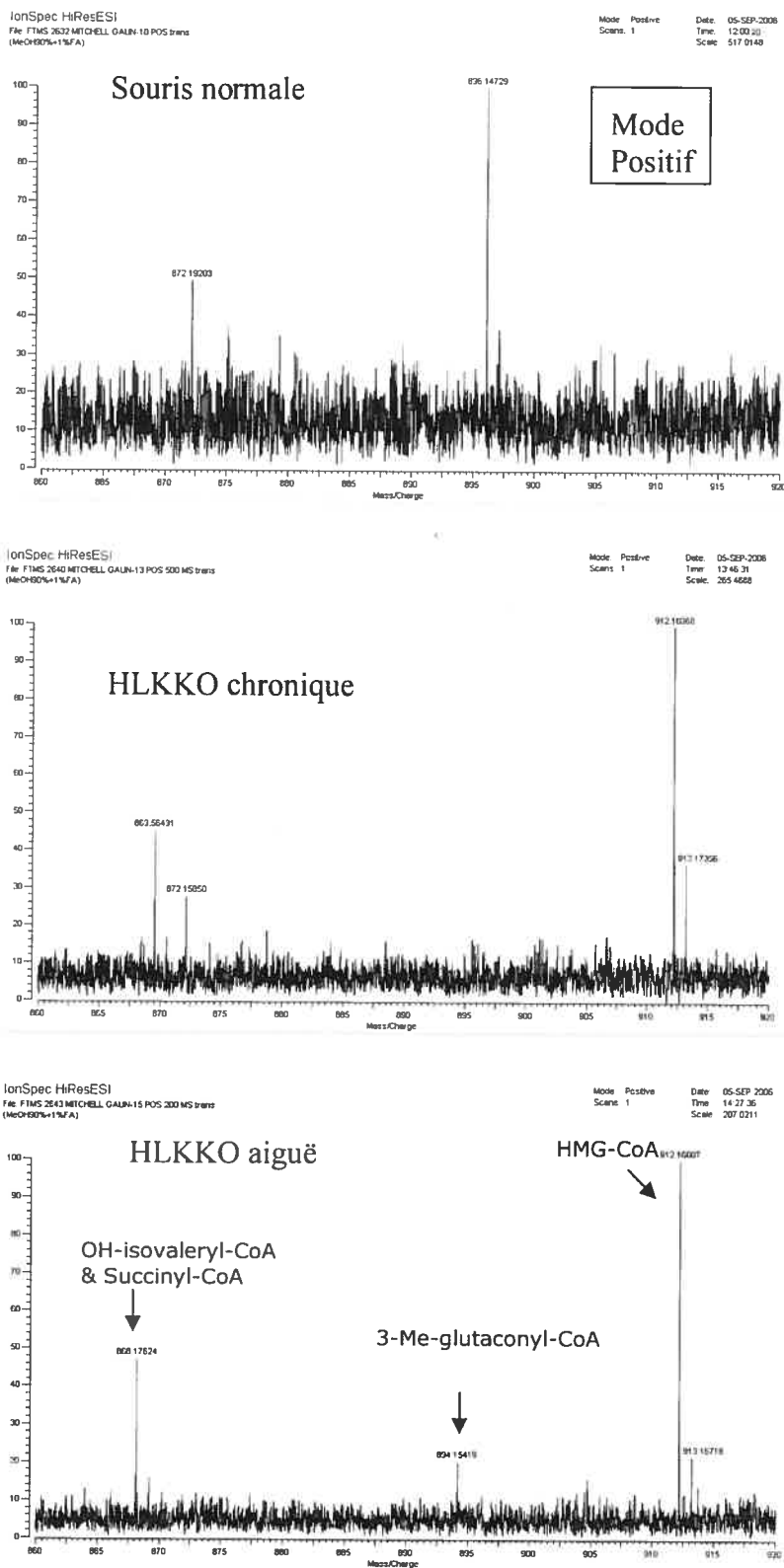
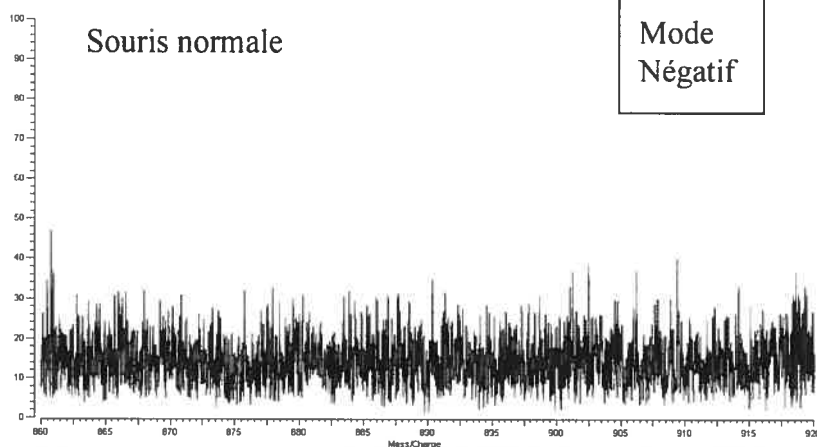


Figure 16a : Identification des acyls-CoA dans le foie. (mode positif)

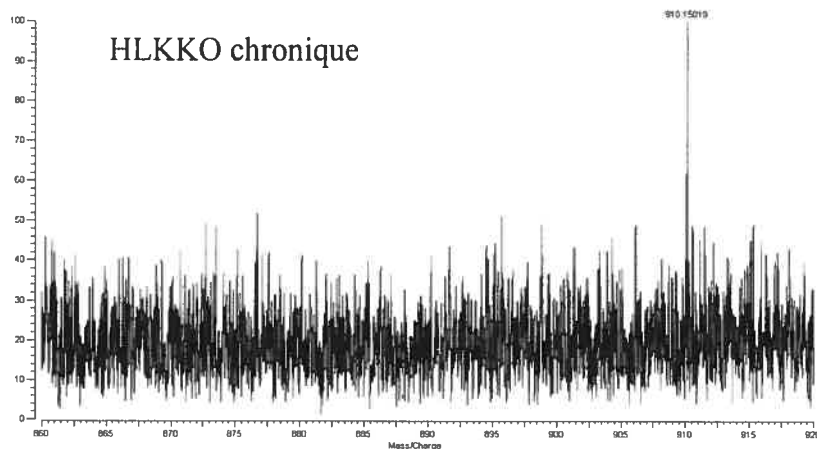
IonSpec HiResESI
 File: FTMS 2633 MITCHELL GALN-10 NEG trans
 (MeOH90%-1%FA)

Mode: Negative Date: 05-SEP-2006
 Scans: 1 Time: 12:01:35
 Scale: 600.0000



IonSpec HiResESI
 File: FTMS 2641 MITCHELL GALN-13 NEG MS trans
 (MeOH90%-1%FA)

Mode: Negative Date: 05-SEP-2006
 Scans: 1 Time: 13:50:54
 Scale: 811.4732



IonSpec HiResESI
 File: FTMS 2644 MITCHELL GALN-15 NEG MS trans
 (MeOH90%-1%FA)

Mode: Negative Date: 05-SEP-2006
 Scans: 1 Time: 14:30:21
 Scale: 151.7029

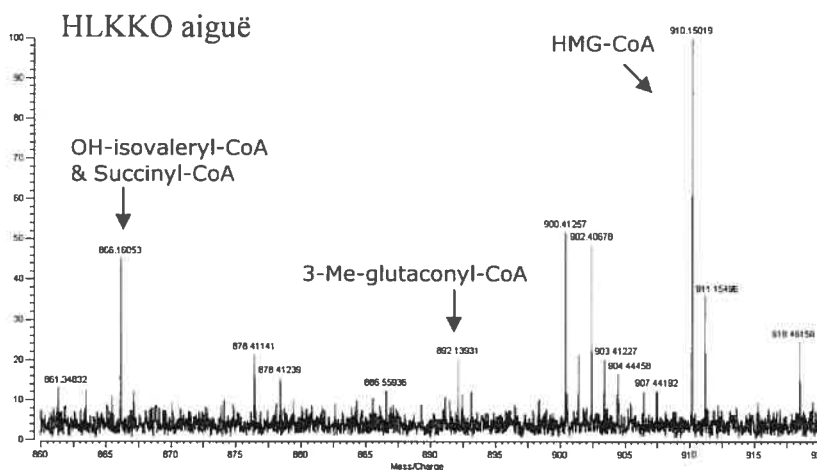


Figure 16b : Identification des acyls-CoA dans le foie. (mode négatif)

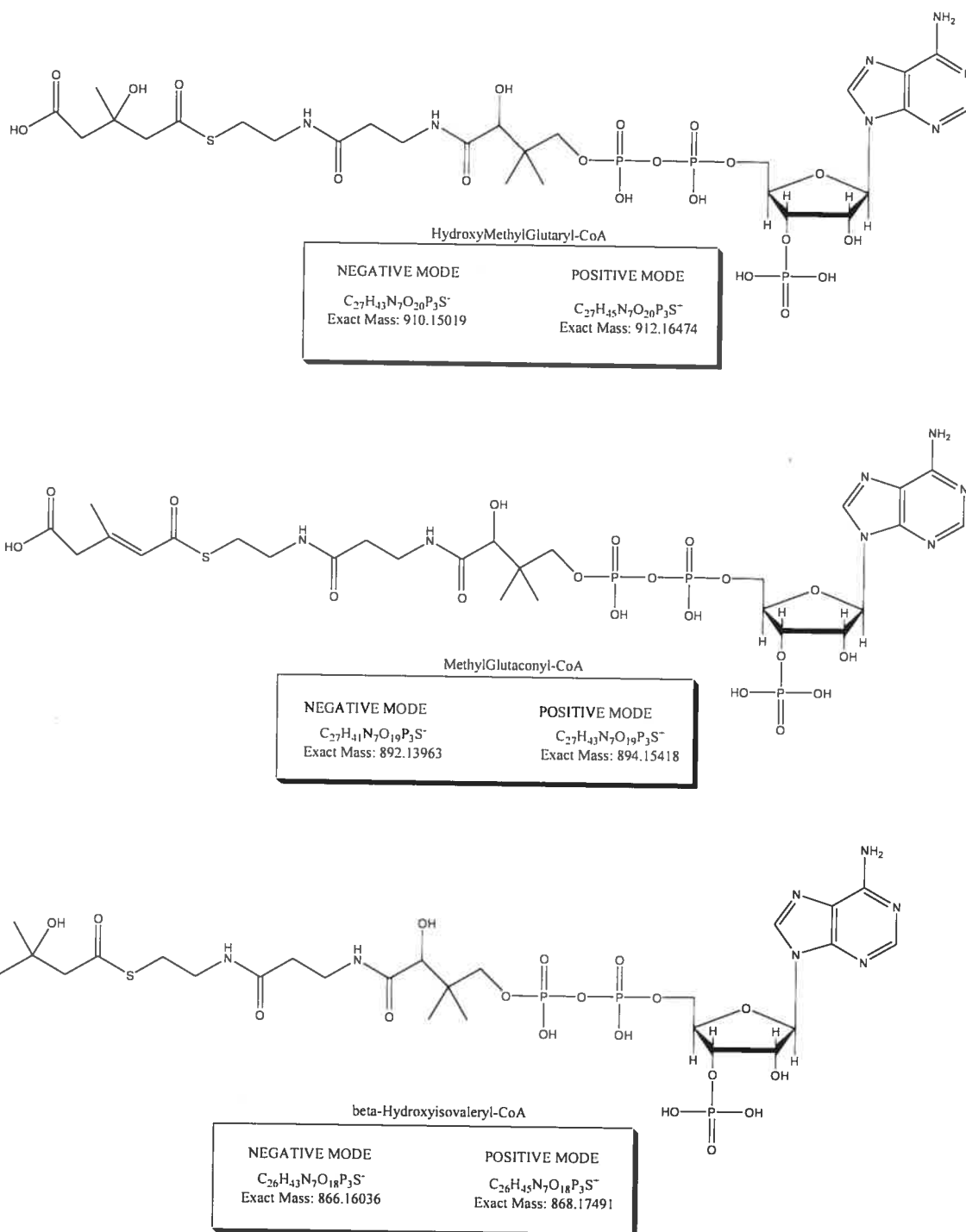


Figure 16c : Identification des acyls-CoA dans le foie. (structures et masses)

Figure 16(a-c): Identification des acyls-CoA dans le foie. De haut en bas sont présentés des extraits suivants : foie normal, foie d'une souris HLLKO mais stable sur le plan clinique et foie d'une souris HLLKO en décompensation. Spectres obtenus en mode (a) positif et (b) négatif en *FTMS* (fourier-transform mass spectrometry). (c) Structure et masses des dérivés CoA de la leucine identifiables dans les foies de souris HLLKO. (Résultats obtenus par Dr O. Mamer)

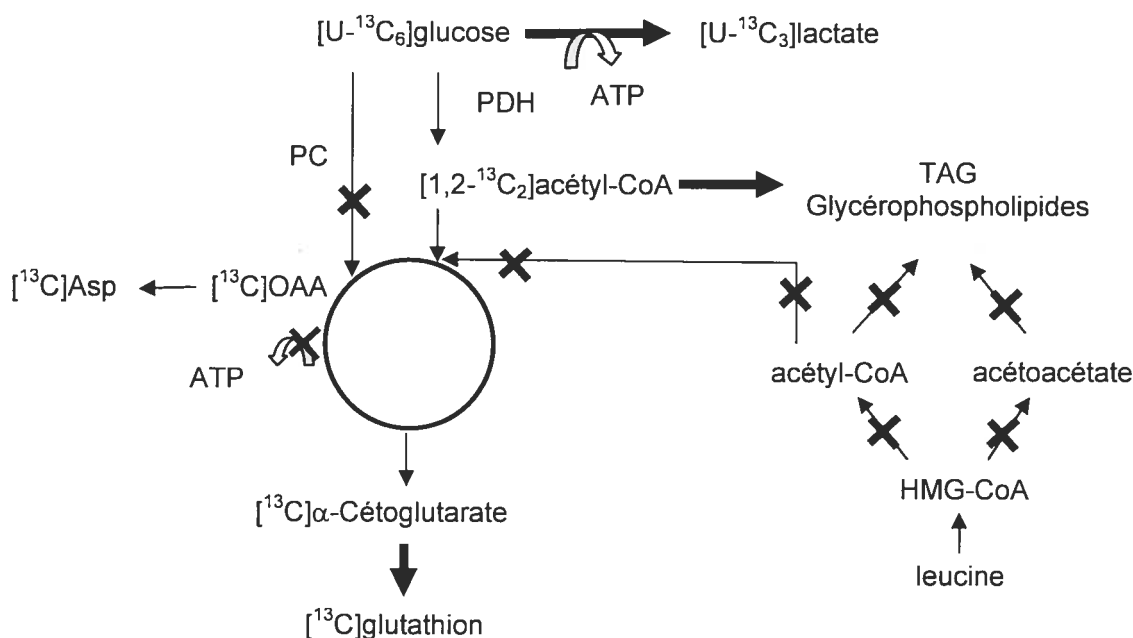


Figure 17: Résumé des résultats obtenus par résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'évaluation du métabolisme énergétique hépatique des souris HLLKO suite à l'injection de $[U-^{13}C_6]$ glucose. Les X représentent les voies métaboliques dont l'activité est diminuée et les flèches en gras représentent les voies dont l'activité est augmentée selon l'étude par RMN.

3.10 Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'évaluation du métabolisme énergétique a été réalisée entièrement par la Dre Claudia Zwingmann du CHUM St-Luc. Bien que je n'aie pas participé directement à l'obtention de ces résultats, ils sont présentés dans le présent mémoire puisqu'ils complètent mes travaux. Ceci a pour but l'obtention d'une vision intégrée du métabolisme énergétique dans les hépatocytes HL-/- . Suite à une injection de [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose (2.78 mMol/kg; i.v., veine de la queue), le métabolisme énergétique est fortement perturbé dans le foie des souris HLLKO tel que démontré dans la figure 17. Une seule injection en bolus a été choisie afin d'étudier les changements métaboliques chez la souris éveillée et afin de conserver le niveau de glucose sanguin à moins de 10 mM. Les souris étaient sacrifiées 45 minutes après l'injection par dislocation cervicale. Le foie et le cerveau étaient immédiatement congelés dans l'azote liquide.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

4.1 Validation génétique du ciblage

La motivation à la base de ce projet était de créer un modèle murin de maladie de type CASTOR développant des signes cliniques semblables à ceux présents chez les enfants atteints de la même déficience enzymatique. La technique d'inactivation conditionnelle Lox-Cre du gène *Hmgcl* a été retenue. Le retrait de l'exon 2 a été choisi pour inactiver l'enzyme HL, puisque chez les patients, il est le site de plusieurs mutations qui diminuent l'activité d'HL de 10^4 – 10^5 fois (Mitchell et al., 1998). Théoriquement, aucune activité enzymatique HL ne devrait être observée chez les cellules où l'exon 2 a été excisé.

Le buvardage de type Southern a permis de distinguer les allèles normaux des allèles ciblés avec ou sans excision de la cassette par Cre. Tel qu'attendu, le fragment normal de 3,3 kB généré par les enzymes de restriction *HindIII* et *XbaI* à partir du foie des souris normales. Un fragment de 4,3 kB observé dans les extraits de foie de souris homozygotes (-/-). Il comprend la séquence endogène complète en plus des deux séquences LoxP et le gène de résistance à la néomycine (Figure 5). Puisque le transgène Cre n'est pas exprimé chez ces souris, l'ensemble du vecteur inséré est présent dans le gène d'HL. Le fragment attendu chez les souris HLLKO est de 3,0 kB. Celui-ci représente l'allèle muté grâce à la présence du transgène Cre qui va retirer l'exon 2. Le fragment conserve une séquence LoxP après l'excision. On retrouve effectivement ce fragment chez les souris HLLKO.

Il y a également présence du fragment de 4,3 kB, qui représente l'allèle ciblé pour l'excision de l'exon 2. Rappelons que l'échantillon utilisé est un extrait de foie total. Or, le transgène Cre, nécessaire à l'excision de l'exon 2, est couplé au promoteur de l'albumine. Ce dernier est actif seulement dans les hépatocytes. Dans les autres types cellulaires, le promoteur de l'albumine n'est pas activé et le transgène Cre n'est pas exprimé. Donc, la présence du fragment de 4,3 kB est attendue à cause des autres types cellulaires que les hépatocytes qui sont présents

dans le foie, telles que les cellules de la voie biliaire et les cellules du tissu conjonctif.

Dans le buvardage de type Northern, l'ARN messenger détecté chez la souris HLLKO est plus court que celui détecté chez la souris normale, tel qu'attendu pour un ARNm avec délétion de l'exon 2. Malgré la présence d'un fragment normal chez la souris HLLKO lors de l'analyse de l'ADN, l'ARN messenger normal n'est pas détecté lors de l'analyse par buvardage de type Northern. Quoique HL est exprimé dans toutes les cellules étudiées jusqu'à date (Mitchell, 2001), la transcription d'HL est beaucoup plus active dans les hépatocytes que dans d'autres types cellulaires : ces résultats montrent que l'ARN messenger normal n'est pas détecté dans l'extrait de la souris HLLKO. De plus, la bande de l'ARN messenger plus courte détectée chez la souris HLLKO est de moindre intensité que la bande normale. Cette diminution est probablement expliquée par une perte de stabilité de l'ARN messenger tronqué de l'exon 2. Notons que le cadre de lecture est conservé malgré l'excision de l'exon 2. Alors, le niveau diminué du messenger ne peut être attribuée à la dégradation non-sens (*nonsense-mediated degradation*) (Frischmeyer and Dietz, 1999). En conclusion, les résultats montrent qu'HL est majoritairement exprimé au niveau des hépatocytes et que l'invalidation de l'HL semble complète dans les hépatocytes HLLKO.

Dans l'immunobuvardage de type Western, la protéine HL n'a pas été détectée dans trois différents échantillons de mitochondries de souris HLLKO alors qu'elle est abondante et claire dans l'échantillon de souris normale. Donc, soit l'ARN messenger tronqué n'est pas assez stable pour être traduit, soit la protéine produite est trop instable et elle est dégradée. Puisque les régions 5' de l'ARNm muté sont intactes, il est probable que la traduction s'effectue normalement mais que la protéine est instable. Ceci est noté fréquemment avec les protéines mutées dans les erreurs innées du métabolisme, même s'il n'y a pas d'arrêt prématuré de la traduction (Brody et al., 1992). De toute façon, la protéine

HL est indétectable dans le foie des souris HLLKO, ce qui appuie l'invalidation complète dans les hépatocytes.

Par la suite, j'ai vérifié l'activité d'HL. Dans les homogénats tissulaires, dans le cytoplasme et les mitochondries, l'activité HL était indétectable. De plus, les résultats obtenus sont légèrement plus élevés, mais du même ordre de grandeur que les résultats publiés (Wang et al., 1998). Suite à ces résultats, nous pouvons conclure que l'invalidation génique est efficace dans les hépatocytes des souris HLLKO.

4.2 Phénotype clinique

Afin de valider ce modèle d'étude des maladies CASTOR, la prochaine étape est la comparaison des phénotypes observés chez la souris HLLKO et celui observé dans la déficience humaine en HL.

Contrairement aux souris invalidées de façon constitutive en HL, la souris HLLKO survit jusqu'à la naissance. Notre laboratoire avait émis l'hypothèse que l'absence d'HL dans le foie était responsable de la perte fœtale des souris HL $-/-$, basé sur l'aspect anormal du foie fœtal à l'étude par microscopie électronique (Wang et al., 1998). La viabilité de la souris HLLKO plaide contre cette hypothèse. Toutefois, nous ne pouvons pas strictement l'éliminer. La technique Cre-Lox utilise un promoteur organospécifique pour l'expression de son transgène Cre responsable de l'excision de la séquence située entre les deux LoxP. Dans cette technique, la mutation ne survient qu'à partir du moment où le promoteur est activé. Dans le cas qui nous concerne, le promoteur de l'albumine est actif à partir du jour 6 post-coïtum (Gualdi et al., 1996). Donc, durant les 5 premiers jours suivant la fécondation de l'ovule, il est probable que les embryons HLLKO aient produit de l'HL dans les précurseurs des hépatocytes. La demi-vie de l'HL étant d'environ 15 heures dans les cellules étudiées à date (Mitchell, 2001), cette quantité résiduelle pourrait permettre à l'embryon de survivre à

travers une fenêtre de temps nécessitant absolument la présence d'HL hépatique pour le développement. Nos résultats ne permettent pas d'éliminer cette dernière possibilité, mais il est très plausible que la déficience extrahépatique d'HL pourrait être responsable du décès. Cette question reste sans réponse.

Toutes les souris HLLKO décédait entre 3 et 5 semaines de vie sous des conditions normales de l'animalerie (diète possédant une concentration protéique de 20%). Ces souris se comportaient normalement jusqu'au développement d'une crise pré-mortem sévère. Celle-ci est caractérisée par une hypoglycémie et une importante léthargie. De plus, une stéatose hépatique modérée est observée lors de l'autopsie tel que démontré dans la figure 11. Tous ces signes rappellent le syndrome de Reye et ressemblent beaucoup aux symptômes des patients déficients en HL (Mitchell, 2001).

Toutefois, ces souris pesaient moins que 20 g au moment des crises et donc elles étaient trop petites pour les études métaboliques et l'isolement des hépatocytes. Ces études sont difficiles à réaliser chez les souris âgées de moins de 2 mois.

4.3 Modifications effectuées afin d'obtenir modèle étudiable

Puisque le phénotype en période de crise est semblable aux épisodes aigus des patients déficients en HL, je me suis basé sur les traitements cliniques utilisés en génétique biochimique pour tenter de prolonger la vie des souris et d'éliminer les crises. Ce traitement consiste en une diète faible en protéines mais riche en glucides, particulièrement lors des périodes de catabolisme élevé tel que lors des infections. Un apport glucidique généreux est administré lors des crises. Donc, en me basant sur ces connaissances, j'ai diminué le contenu diététique en protéine à 6% (normal 20%). Le choix de cette diète a également pris en compte les besoins protéiques publiés de la souris. Le minimum de concentration protéique pour permettre une croissance normale de la souris se situe autour de 7%. J'ai trouvé

une diète commerciale contenant 6% de protéines. J'ai également ajouté du glucose dans l'eau (10%). Cet ajout permet de diminuer les périodes de jeûne ainsi que de favoriser le métabolisme glucidique par rapport au métabolisme lipidique. La nouvelle diète est instaurée à partir de la deuxième semaine de vie, alors que les souriceaux ne sont pas encore sevrés. À cet âge, les souriceaux commencent à manger de la diète solide. L'ajout de la diète n'a pas été introduit plus tôt afin de s'assurer que la mère obtienne suffisamment de protéines pour nourrir toute sa portée. De plus, les souriceaux sont sevrés après 28 jours au lieu de 21 jours suite à l'observation de nombreux décès dans la période immédiatement après le sevrage. Ce changement de diète et la prolongation de la période de cohabitation maternelle a augmenté la survie moyenne des souris HLLKO à un âge où elles peuvent facilement être étudiées. Certaines survivaient pendant plus de 7 mois. Ces changements permettront la mise au point de techniques nécessitant beaucoup de précision. Malgré tout, les souris HLLKO sous diète modifiée, ont un taux de mortalité beaucoup plus élevé que les souris contrôle. Elles demeurent également sensibles aux modifications de leur environnement tel que les changements de température.

4.4 Observations biochimiques

L'application de cette diète permet d'étudier les deux formes de la maladie CASTOR, soit la forme chronique et la forme aiguë. La souris HLLKO exposée à la diète faible en protéines et à la supplémentation en glucose dans l'eau est un bon modèle d'étude de la forme chronique de la maladie. Elle présente un niveau anormalement élevé d'acides organiques dans l'urine, une stéatose hépatique (figure 11) et une hypoglycémie contrôlée. L'accumulation de triglycérides intrahépatiques chez les souris HLLKO, observée grâce à la coloration à l'huile rouge confirme la stéatose hépatique suspectée macroscopiquement à l'autopsie.

La forme aiguë est caractérisée par une décompensation sévère. Elle peut survenir de façon spontanée et entraîner le décès de la souris. Cette spontanéité

ainsi que la sévérité de la crise complique son étude. Alors, nous avons tenté avec succès, de provoquer des crises. Pour ce faire, le retour à une diète normale ou une autre charge diététique, une injection intrapéritonéale d' α -ketoisocaproate (α -KIC, un dérivé de la leucine et précurseur d'HMG CoA) ou d'octanoate étaient des techniques potentielles. Des tests ont permis de déterminer que la souris HLLKO développe une hypoglycémie et une léthargie dans les 30 minutes suivant l'injection i.p. de 2 mg/g d' α -KIC.

Une hyperammoniémie a été observée chez une souris HLLKO, mais n'a pas pu être observée dans l'ensemble de la cohorte. L'hypoglycémie survient si précocement et est si sévère, qu'elle entraîne le décès de l'animal avant que l'hyperammoniémie s'installe. Lorsque l'hypoglycémie est contrôlée par des injections i.p. de glucose, une hyperammoniémie est observée dans l'ensemble des souris HLLKO, en moyenne 260 μ M chez la souris HLLKO vs 75 μ M chez la souris contrôle.

Le dosage des acides organiques urinaires des souris HLLKO et des témoins, dans un état stable sous diète spéciale, a été réalisé par le laboratoire de notre collaborateur, le Dr Orval Mamer. La détection est effectuée par spectrométrie de masse. Les résultats sont normalisés à la concentration de créatinine. Il s'agit d'une procédure standard utilisée pour les rapports des acides organiques pour les patients afin de contrôler pour la variabilité physiologique de la concentration urinaire. Les résultats montrent un patron semblable à celui observé chez les patients déficients en HL, soit une augmentation de l'acide 3-hydroxy-3-méthylglutarique, l'acide hydroxyisovalérique et l'acide 3-méthylglutaconique. Ces acides sont des dérivés des intermédiaires acyls-CoA, rencontrés dans la dégradation de la leucine. L'acide 3-hydroxyisobutyrique et les conjugués avec la glycine, N-isovaleryl glycine, et 3-methylcrotonyl glycine, sont également liés à la voie de dégradation de la leucine (figure 3). Cette accumulation d'acides organiques liés à la voie de dégradation de la leucine, supporte l'hypothèse d'un blocage complet de la voie provoquant une

accumulation des intermédiaires de dégradation de la leucine situés en amont de la réaction d'HL.

L'acide lactique et les acides fumarique, succinique et 2-ketoglutarique, intermédiaires du cycle de Krebs, sont anormalement élevées dans l'urine des souris HLLKO. Ces observations suggèrent un dérangement physiologique du métabolisme énergétique. Un blocage de la chaîne respiratoire ou du cycle de Krebs expliquerait l'accumulation de l'acide lactique ainsi que la détection des intermédiaires du cycle de Krebs. Cette accumulation pourrait être due à l'impossibilité d'utiliser les produits du cycle, le NADH et le FADH et à l'abondance des précurseurs du cycle de Krebs. Le patron d'acides organiques dérivés de la leucine observé chez la souris HLLKO est similaire à celui observé chez le patient humain en HL. Le patron général observé est caractéristique d'un dérangement généralisé du métabolisme énergétique de base, même chez des souris qui ne présentent aucun symptôme. Ces observations appuient l'utilisation des souris HLLKO comme modèle animal des maladies CASTOR.

Le phénotype des crises observées chez la souris ressemble à celui observé chez le patient déficient en HL. Toutes les observations soutiennent la notion que la souris, sous la forme chronique, ressemble aux patients, qui même à l'état stable, présentent une accumulation urinaire d'acides organiques liée à la dégradation de la leucine. Le modèle permet donc d'étudier les deux formes, d'une maladie CASTOR, aiguë et chronique.

4.5 Isolement et évaluation de la qualité des hépatocytes

Afin d'étudier le métabolisme hépatique, j'ai mis au point la technique d'isolement des hépatocytes. Tout d'abord, l'amélioration de la survie des souris HLLKO grâce à la diète était essentielle pour l'application de cette technique puisque elle permet l'utilisation de souris plus âgées et plus grosses. L'étape de la cannulation de la veine porte est un défi technique et dont le taux de réussite

aurait été trop faible avec des souris âgées de 3 semaines et ayant un poids de moins de 20g, d'où l'importance du changement de diète pour la réussite de cette technique.

Étant donné que la technique a été mise au point sur des rats au départ, des modifications étaient nécessaires afin de l'adapter aux souris. Le débit a été testé à 3 vitesses différentes soit 5, 7 et 9 mL/min. Le débit maximal entraîne rapidement la rupture de la veine porte, empêchant la digestion de s'effectuer. Bien que le débit de 5 mL/min ait donné des résultats de viabilité acceptables, le débit de 7 mL/min a permis d'en obtenir une meilleure, avec plus de reproductibilité. La température du bain a été ajustée en fonction de la longueur de la tubulure afin que la température finale pour la perfusion soit de 37°C. Trois types de collagénase de deux différentes compagnies ont été testées avant de trouver un produit et un lot qui permettait une digestion optimale (total 6 lots testés). Seuls deux lots de collagénase de type 1 de la compagnie Worthington m'ont permis d'obtenir une digestion du foie et un lot m'a permis d'obtenir une viabilité acceptable de plus de 50%. Les autres échantillons ne digéraient pas le foie ou ne permettaient pas une viabilité des hépatocytes. Il est à noter que cette analyse de rendement et de viabilité doit être effectuée avec chaque changement de lot de collagénase, puisque leur activité et leur efficacité est variable. Un ajustement des concentrations utilisées de collagénase m'a permis d'augmenter la viabilité des cellules à plus de 75%.

Toutes ces modifications, décrites dans la section "Matériels et Méthodes", m'ont permis d'obtenir une bonne viabilité de façon reproductible. Rappelons que celle-ci doit être d'au moins 75% afin de pouvoir mettre les hépatocytes en culture primaire. Elle est mesurée grâce au test d'exclusion du bleu de Trypan, un colorant vital qui est exclu des cellules vivantes. L'aspect morphologique des hépatocytes est également pris en considération lors de l'évaluation de la viabilité. Ainsi seule une cellule ayant un aspect normal (rond et ayant un aspect sphérique à travers les champs du microscope) sera comptée

comme vivante. Les hépatocytes isolés par cette technique fait preuve d'une capacité métabolique lors des différents tests présentés dans ce mémoire. L'isolement des hépatocytes permet d'obtenir un modèle cellulaire de la déficience humaine en HL. Il s'agit de la première fois que l'on peut étudier une maladie CASTOR symptomatique dans un tissu pertinent à la physiopathologie humaine.

4.6 Évaluation de l'activité de la cétogenèse

La première étude qui a été effectuée sur les hépatocytes isolés a été le dosage de la cétogenèse. À des concentrations croissantes d'octanoate comme précurseur, on observe un plateau dans la production de corps cétoniques à des concentrations élevées dans les hépatocytes contrôles. Dans des hépatocytes HLLKO, aucune production de corps cétoniques n'a été détectée. Il s'agit de la première démonstration directe qu'HL est essentielle à la cétogenèse à partir des acides gras. Aucune voie accessoire de la cétogenèse n'est détectable. Inversement, ce résultat confirme indépendamment l'efficacité de l'invalidation d'HL dans les hépatocytes des souris HLLKO. Cette expérience montre également la possibilité d'utiliser les hépatocytes isolés pour étudier certaines voies métaboliques.

4.7 Chaîne respiratoire

Étant donné la présence de l'acide lactique urinaire ainsi que des nombreux intermédiaires du cycle de Krebs, j'ai évalué l'activité de la chaîne respiratoire des mitochondries isolées de foie de souris HLLKO par polarimétrie, ceci dans le but de déterminer si un blocage de la chaîne respiratoire pourrait expliquer l'accumulation des métabolites détectés. Les résultats ne montrent pas de différence entre les mitochondries HLLKO et les contrôles au niveau de la respiration à l'état 3, soit à la consommation de l'oxygène en présence d'une

haute concentration d'ADP, ce qui indique la capacité maximale de la chaîne respiratoire à produire de l'ATP. Le RCR (ratio du contrôle respiratoire), soit le rapport entre l'état 3 et l'état 4, indique que la préparation mitochondriale est de bonne qualité puisqu'il est au dessus de 4. L'ADP/O représente le ratio ADP utilisé par rapport à l'oxygène consommé. La valeur idéale se situant à 3, les valeurs obtenues dans les mitochondries de souris HLLKO et contrôles s'en rapprochent beaucoup (tableau IV).

Il est à noter que les résultats sont très faibles lors de la préincubation de 37 minutes avec 20mM d' α -KIC. La concentration et le temps retenus pour la préincubation sont très importants. Ceux-ci pourraient entraîner une diminution de la viabilité des mitochondries et donc une diminution des valeurs observées. Ce test a été effectué afin de vérifier l'effet d'une concentration très importante d' α -KIC sur l'activité de la chaîne respiratoire.

En conclusion, les résultats obtenus dans ces expériences préliminaires n'indiquent pas de diminution dans les mitochondries de souris HLLKO, de la capacité de la chaîne respiratoire à produire de l'ATP. L'accumulation des acides organiques détectés dans l'urine n'est donc pas causée par une inhibition de la chaîne respiratoire. Ce qui suggère une autre origine pour l'excès des métabolites du cycle de Krebs et du lactate.

4.8 Cycle de Krebs

Suite aux résultats négatifs obtenus par polarimétrie et étant donné la présence importante dans l'urine des acides organiques liés au cycle de Krebs chez les souris HLLKO, j'ai dosé directement le flux du cycle de Krebs. Les études de flux ont été réalisées sur des hépatocytes isolés à l'aide du [2- 14 C]pyruvate comme substrat énergétique. En dosant le 14 CO₂ produit par le cycle de Krebs, il est possible d'évaluer la capacité à métaboliser le pyruvate. Afin de vérifier l'effet de l'accumulation de métabolites en amont d'HL, j'ai vérifié l'effet

d'une préincubation de 30 minutes avec différentes concentrations d' α -KIC, soit 1, 2 et 4 mM. La préincubation avec α -KIC a entraîné une diminution du flux du cycle de Krebs dans les hépatocytes des souris HLLKO alors qu'une légère augmentation est observée dans les hépatocytes des souris contrôle. Cette diminution de l'activité pourrait s'expliquer par un phénomène CASTOR. L'accumulation des acyls-CoA en amont d'HL, engendrerait une séquestration du CoA libre, ceci ayant comme effet de diminuer la disponibilité du CoA libre pour les autres réactions du métabolisme. Dans le cycle de Krebs, deux réactions nécessitent la présence du CoA, soit pour former l'acétyl-CoA et le succinyl-CoA. Une diminution du CoA entraînerait un ralentissement du cycle de Krebs. L'accumulation d'autres acyls-CoA pourrait, en théorie, inhiber les enzymes 2-cétoglutarate déshydrogénase et citrate synthase.

L'augmentation observée du flux du cycle de Krebs dans les hépatocytes normaux en fonction de la concentration d' α -KIC ajoutée est surprenante. Une augmentation du flux du cycle de Krebs est possible étant donné que la voie de la cétogenèse produit de l'acétyl-CoA qui est le précurseur du cycle de Krebs. Mais comme celui-ci entre en aval du pyruvate, il n'y aurait aucune entrée du [2- 14 C]pyruvate dans le cycle de Krebs par la PDH. De plus, l'acétyl-CoA est un inhibiteur de la PDH. Donc, il n'y aurait pas de raisons que l'on mesure une augmentation de la production de $^{14}\text{CO}_2$. L'hypothèse émise pour expliquer cette augmentation, est que le [2- 14 C]pyruvate entre par la voie de la pyruvate carboxylase afin d'assurer un apport anaplérotique d'oxaloacétate. En effet, l'enzyme PC est activée par l'acétyl-CoA pour produire l'oxaloacétate. Le [2- 14 C]pyruvate pourrait également entrer par l'enzyme malique puisqu'elle est NADP^+ dépendante. Rappelons que le HMG-CoA produit par la dégradation d' α -KIC, ne pourrait servir à la production de cholestérol puisque la membrane est imperméable aux acyls-CoA. La formation du cholestérol ayant lieu à l'extérieur de la mitochondrie, l' α -KIC doit passer par la cétogenèse pour être dégradé.

En résumé un ajout d' α -KIC, donc une surcharge de la voie de dégradation, engendre une diminution du flux du cycle de Krebs. La diminution observée, de l'ordre de 40%, pourrait engendrer des problèmes importants au niveau métabolique. Même, un léger changement de flux du cycle de Krebs a des effets importants sur les autres voies métaboliques.

4.9 Autres voies

La mise au point du dosage de la néoglucogenèse est présentement en cours. Les données préliminaires (non présentées ici) suggèrent que les mesures de l'activité de cette voie pourront être réalisées bientôt. La mesure de la néoglucogenèse est une étape essentielle pour le projet. Une inhibition de cette voie pourrait contribuer directement à l'hyperlactatémie observée chez les souris HLLKO. La néoglucogenèse fait parti du cycle de Cori par lequel le lactate et le pyruvate libérés par le muscle et d'autres organes sont utilisés par le foie pour resynthétiser le glucose. De plus, l'hypoglycémie observée chez les souris HLLKO provient fort probablement d'une faible capacité du foie à produire du glucose puisque la capacité de son oxydation dans les organes extrahépatiques ne devrait pas être augmentée dans ce modèle invalidé hépatospécifiquement.

La mise au point du dosage de l'uréagenèse est également en cours. Les données non présentées ici sont reproductibles malgré qu'elles soient préliminaires. Toutes les souris transgéniques ne sont pas hyperammoniémiques au moment des crises, mais nous avons pu documenter plusieurs instances d'hyperammoniémie à des taux qui chez l'humain seraient associés à une stupeur ou un coma. Nous émettons donc l'hypothèse que l'hyperammoniémie n'a pas le temps de se développer chez les autres souris. Trois raisons appuient ce raisonnement. Premièrement, l'hypoglycémie se développe rapidement et entraîne le coma et le décès. Deuxièmement, la diète hypoprotidique protège les souris contre le développement de l'hyperammoniémie. Troisièmement, lors de l'injection i.p. d' α -KIC, si l'hypoglycémie est contrôlée par des injections i.p. de glucose, la totalité des souris HLLKO développent une hyperammoniémie.

4.10 Dosage des acyls-CoA par spectrométrie de masse

En collaboration avec l'équipe du Dr Orval Mamer de l'unité de spectroscopie de masse de l'Université McGill, nous avons mis au point une technique d'évaluation du niveau des différents acyl-CoA dans le foie. Tous les travaux présentés utilisant la spectrométrie de masse ont été effectués par l'équipe du Dr Mamer.

La première étape a été d'analyser des échantillons purs des acyls-CoA et d'observer leur profil de fragmentation. Les échantillons purs d'HMG-CoA et de glutaryl-CoA, à titre de comparaison, ont été analysés par spectrométrie de masse à triple quadrupoles avec une source à ions négatifs par vaporisation électronique (*negative ion electrospray*). Les analyses de scan ont montré qu'il est possible de détecter ces molécules par cette technique. De plus, la fragmentation secondaire des acyls-CoA par DIC (dégradation induite par la collision) entraîne la formation d'un patron qui permettra de différencier les différents acyl-CoA. La différence de masse de 30 Da entre le G-CoA et l'HMG-CoA est retrouvée dans les fragments représentant les groupements acyls et les fragments identiques représentant le noyau CoA sont générés par chacune des molécules étudiées.

Après avoir démontré qu'il était possible de détecter des acyls-CoA en spectrométrie de masse, nous avons utilisé un *FTMS* pour l'analyse de nos échantillons. L'analyse des acyls-CoA dans les échantillons biologiques a demandé une longue mise au point de la technique d'extraction, que j'ai effectuée. La première étape consistait à dessaler un homogénat de foie à l'aide d'un lavage à l'éthanol. Cet échantillon a révélé une forte contamination aux phosphatidylcholines. Ceux-ci ont un ratio masse sur charge (m/z) du même ordre que les acyls-CoA à chaînes courtes que nous tentions d'analyser. Le signal lié aux phosphatidylcholines est très fort et empêche la détection des acyls-CoA. Plusieurs techniques de purification ont été testées, dont l'utilisation d'une

colonne de purification des oligonucléotides (Kalderon et al., 2002), ce que nous avons essayé puisque le noyau CoA est similaire à l'adénine (figure 1). Cette approche n'a pas fonctionné car la contamination aux phosphatidylcholines était toujours présente. Finalement, l'utilisation de colonne de purification à phase inverse, (telle que décrite dans la section "Matériel et Méthodes") a permis de diminuer suffisamment la contamination par les phosphatidylcholines pour permettre la détection des acyl-CoA dans le foie des souris HLLKO.

Cette technique de préparation des échantillons a permis d'identifier l'HMG-CoA, le 3-méthylglutaconyl-CoA, le succinyl-CoA et le 3-hydroxyisovaleryl-CoA dans les foies d'animaux transgéniques. Ces produits issus du catabolisme de la leucine sont détectés uniquement dans les échantillons préparés à partir des souris HLLKO. Il s'agit de la première preuve directe d'une accumulation intrahépatique des intermédiaires CoA de dégradation de la leucine dans une maladie CASTOR symptomatique.

Étant donné que les molécules ne sont pas détectées chez les souris normales, il est possible de conclure qu'elles sont présentes en concentration anormalement élevée dans le foie HLLKO. Il s'agit d'une observation qualitative qui documente une franche différence entre les souris HLLKO et les souris normales. La quantification précise des intermédiaires constitue la prochaine étape. Pour ce faire, des composés deutérés seront utilisés comme standard externe. L'amélioration de la technique afin de permettre la détection du CoA libre et de l'acétyl-CoA fait partie de la prochaine étape de développement.

Le but recherché, dans un avenir rapproché, est de corrélérer la concentration des différents acyls-CoA avec le phénotype clinique observé chez la souris. Pour la première fois, nous pourrons faire le lien direct entre les signes cliniques, les métabolites circulants, les métabolites intra-cellulaires et les différentes voies métaboliques dans une maladie CASTOR symptomatique. Cette technique nous permettra de suivre l'effet de différents traitements ainsi que de dresser un portrait précis des événements liés à une maladie CASTOR.

4.11 Spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les résultats préliminaires obtenus par la Dre Claudia Zwingmann a permis de montrer un métabolisme énergétique globalement perturbé. Elle a effectué ses analyses 45 minutes après l'injection i.v. d'une charge de [U- $^{13}\text{C}_6$]glucose simulant un état postprandial. Le foie de souris HLLKO présente une diminution de la concentration d'ATP et une augmentation de la concentration d'ADP. Le flux via la pyruvate carboxylase (PC) est sévèrement réduit. Notons que le positionnement du ^{13}C sur l' α -Cétoglutarate diffère selon que l'entrée du glucose dans le cycle de Krebs a été effectuée par l'enzyme PC ou PDH. Une diminution considérable de l'aspartate et une augmentation de la synthèse du lactate sont également observées. De plus, les groupements [^{13}C]acétyl sont redistribués vers la synthèse des lipides. Ces observations, bien que préliminaires, suggèrent une nouvelle cible pathologique pour les maladies CASTOR, soit le cycle de Krebs et les voies métaboliques reliées. Les diminutions du ratio ATP/ADP et du flux via la pyruvate carboxylase sont consistantes avec la diminution du flux du cycle de Krebs observée directement dans mes expériences (figure 14) et suggéré par l'ensemble des résultats RMN. La diminution du flux par la PC pourrait s'expliquer par le fait que l'augmentation de la concentration de l'acétyl-CoA inhibe l'activité PC. L'acétyl-CoA pourrait être réduit par la diminution de sa production par la cétogenèse mais également par les autres voies suite à une diminution de la concentration intramitochondriale de CoA libre nécessaire à sa formation. La redistribution des groupements acétyl vers la synthèse des lipides pourrait, quant à elle, expliquer l'apparition de la stéatose hépatique observée dans les maladies de type CASTOR.

Les étapes futures permettront de valider les observations et les hypothèses décrites ci-haut. L'utilisation de concentrations plus faibles (traceur) de [U- $^{13}\text{C}_6$] glucose permettra d'évaluer le métabolisme glucidique des souris HLLKO à son état normal plutôt que lors d'une charge hyperglycémique. Des études métaboliques avec [U- $^{13}\text{C}_6$] leucine permettront d'obtenir une vue d'ensemble plus complète du métabolisme hépatique des souris HLLKO sous

forme chronique. Cette meilleure connaissance métabolique des souris HLLKO obtenue grâce à la technique RMN, permettra d'évaluer les changements métaboliques provoqués par différentes molécules (drogues, médicaments...) qui seront testées au cours de mes études doctorales.

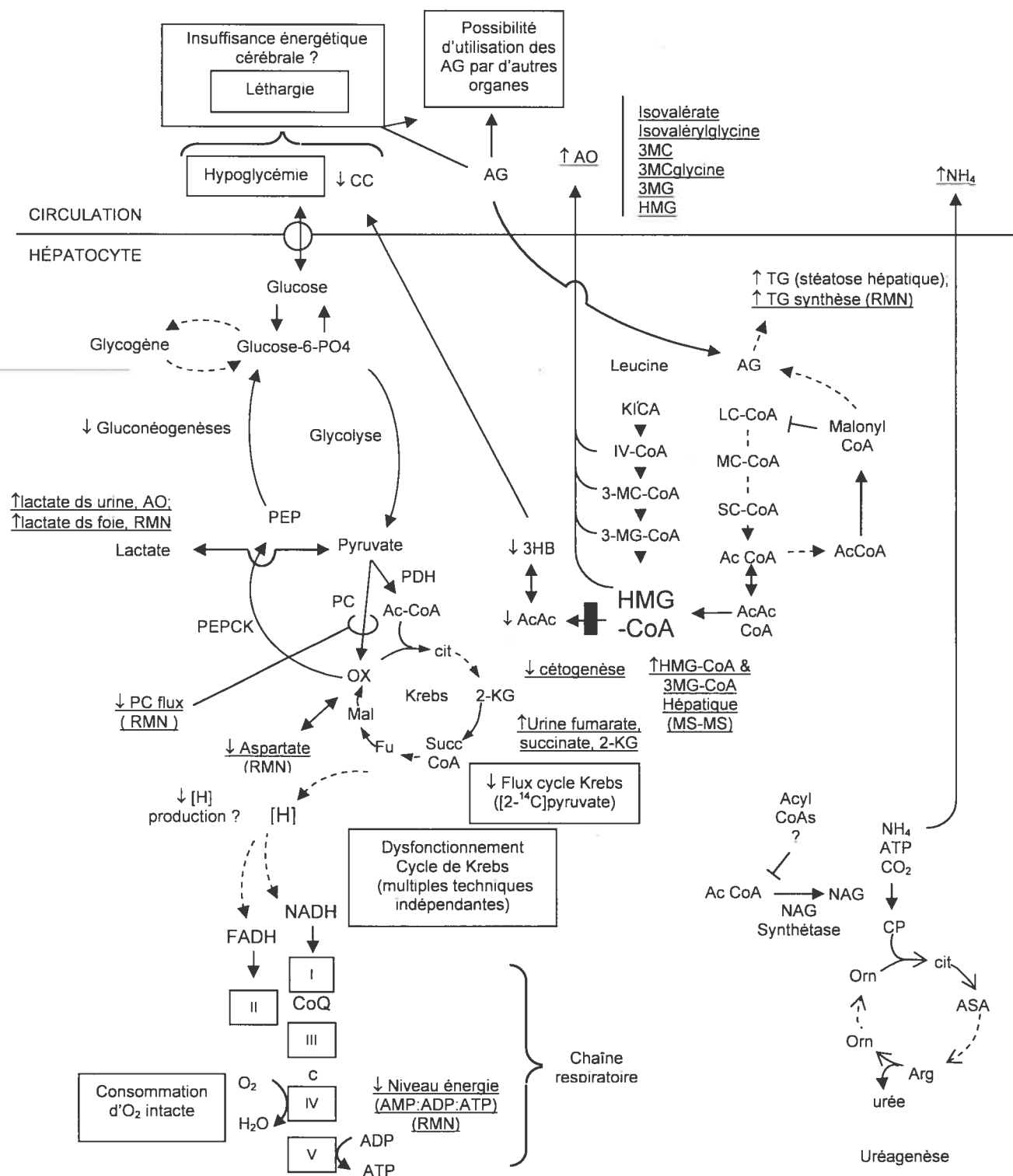


Figure 18 : Physiopathologie de la déficience en HL dans le foie de souris, basée sur les résultats obtenus à ce jour. La légende de la figure se retrouve à la page suivante

Légende de la figure 18 : Les voies majeures du glucose, des acides gras et du métabolisme de l'ammoniaque sont présentées puisqu'elles dominent le portrait clinique de la déficience en HL chez l'humain. Les résultats obtenus à l'aide de différentes techniques (analyse des métabolites, des voies métaboliques, par RMN...) sont complémentaires et dressent un portrait complet de cet état CASTOR. Les encadrés représentent les observations confirmées, les textes soulignés représentent les données préliminaires (une seule observation) alors que les hypothèses et les intermédiaires qui n'ont pas encore été mesurés sont agrémentés d'un point d'interrogation (?). (OA : acide organiques)

4.12 Portrait global du métabolisme protéique et énergétique des souris HLLKO

Les études réalisées à date sur la souris HLLKO permettent de dresser un premier portrait global de la déficience en HL (figure 18) La validation génétique du ciblage et l'absence d'activité d'HL ont été démontrées. HL est essentielle à la cétogenèse. Le patron des acides organiques observé dans le modèle murin est semblable à celui rencontré chez le patient et montre en plus un déséquilibre du métabolisme énergétique chez la souris HLLKO. De plus, les études par spectrométrie de masse ont permis de détecter l'accumulation intrahépatique des acyls-CoA spécifiques à la déficience en HL.

Au niveau du métabolisme énergétique, une diminution du flux du cycle de Krebs a été observée, ce qui est consistant avec la présence en concentration anormalement élevée, d'acides organiques urinaires reliés au métabolisme énergétique. Cette diminution pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs. Le premier étant, selon l'hypothèse centrale des maladies CASTOR, que la diminution du CoA libre empêche le bon fonctionnement de réactions enzymatique du cycle de Krebs.

Toujours selon cette hypothèse, la diminution de la concentration de CoA libre interférerait avec la production d'acétyl-CoA dont la production est déjà diminuée par l'inactivité de la cétogenèse. Une diminution de l'activité du cycle de Krebs s'en suivrait puisque l'acétyl-CoA est le précurseur principal du cycle. De plus, une faible concentration d'acétyl-CoA engendre une inactivation de la PC. La diminution de son flux est fortement suggérée les données obtenues par RMN. Une diminution de la production d'oxaloacétate par la PC pourrait également expliquer l'accumulation urinaire des intermédiaires du cycle de Krebs. Cette diminution du flux du cycle de Krebs fournirait moins de précurseurs (NADH, FADH) pour la chaîne respiratoire, d'où la diminution de la charge énergétique détectée par RMN. L'augmentation des concentrations de lactate, détectée dans l'urine et dans le foie (RMN), pourrait provenir d'une élévation des

niveaux de pyruvate, due potentiellement à la diminution du flux du cycle de Krebs.

Une élévation des triglycérides intracellulaires est démontrée par la stéatose hépatique. De plus, les études par RMN ont également démontré une élévation de la synthèse des triglycérides. Ces hausses pourraient s'expliquer par l'impossibilité des groupements acétyls dérivés des acides gras à traverser la voie de la cétogenèse et à être exportés.

Bien que le schéma métabolique, présenté ci-haut, devra être testé de plusieurs façons avant d'être accepté, il relie toutes les observations obtenues avec les différentes techniques. Il nous offre un modèle qui va être testé de façon explicite.

4.13 Perspectives futures du projet

Les résultats présentés dans ce mémoire font le point sur mes travaux qui sont à une étape intermédiaire. Mon projet de doctorat prendra la suite de celui de ma maîtrise. Je vais caractériser les états chroniques et aigus de la déficience hépatique en HL. Pour ce faire, la spectrométrie de masse ainsi que le RMN seront utilisées et les expériences seront basées sur les résultats présentés ici. Une étude de l'efficacité ou de la toxicité de différentes molécules utilisées dans la clinique pour le traitement des maladies CASTOR (carnitine, pantothénate, valproate,...) fait également partie de mon projet de doctorat. Une nouvelle approche thérapeutique sera testée chez ces souris transgéniques. Il s'agit de l'utilisation de thioestérases qui clivent les liens thioester des acyls-CoA. Ceci afin d'augmenter la concentration intramitochondriale de CoA libre. Pour ce faire, nous allons exprimer une thioestérase (ACOT8) dans les mitochondries hépatiques à l'aide d'un adénovirus recombinant. Finalement, l'effet de l'invalidation d'HL dans d'autres organes que le foie, tel que le cerveau ou le cœur, pourra être étudiée.

Ce modèle offre, pour la première fois, la possibilité d'explorer la chaîne d'événements reliant le défaut génétique aux symptômes cliniques observés dans une maladie CASTOR : mutation, ARN, protéine, activité enzymatique, métabolites circulants, métabolites intracellulaires, voies métaboliques et signes cliniques. Durant ma maîtrise, j'ai développé toutes les techniques essentielles dans une étude intégrative qui permettra de rassembler les mailles de cette chaîne d'événements. J'espère que la poursuite de ces études durant mon doctorat aura un impact sur la qualité de vie des patients atteints de la déficience en HL et/ou d'autres maladies CASTOR.

CHAPITRE 5 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Amendt, B.A., Freneaux, E., Reece, C., Wood, P.A., and Rhead, W.J. (1992). Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase activity, antigen, and biosynthesis are absent in the BALB/cByJ mouse. *Pediatric research* 31, 552-556.

Ashmarina, L.I., Pshezhetsky, A.V., Branda, S.S., Isaya, G., and Mitchell, G.A. (1999). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase: targeting and processing in peroxisomes and mitochondria. *Journal of lipid research* 40, 70-75.

Ashmarina, L.I., Rusnak, N., Miziorko, H.M., and Mitchell, G.A. (1994). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase is present in mouse and human liver peroxisomes. *The Journal of biological chemistry* 269, 31929-31932.

Boukaftane, Y., Duncan, A., Wang, S., Labuda, D., Robert, M.F., Sarrazin, J., Schappert, K., and Mitchell, G.A. (1994). Human mitochondrial HMG CoA synthase: liver cDNA and partial genomic cloning, chromosome mapping to 1p12-p13, and possible role in vertebrate evolution. *Genomics* 23, 552-559.

Boukaftane, Y., and Mitchell, G.A. (1997). Cloning and characterization of the human mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase gene. *Gene* 195, 121-126.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.

Brody, L.C., Mitchell, G.A., Obie, C., Michaud, J., Steel, G., Fontaine, G., Robert, M.F., Sipila, I., Kaiser-Kupfer, M., and Valle, D. (1992). Ornithine delta-aminotransferase mutations in gyrate atrophy. Allelic heterogeneity and functional consequences. *The Journal of biological chemistry* 267, 3302-3307.

Buemi, M., Floccari, F., Nostro, L., Campo, S., Caccamo, C., Sturiale, A., Aloisi, C., Giacobbe, M.S., and Frisina, N. (2007). Statins in the prevention of cardiovascular events in patients with renal failure. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets* 7, 7-13.

Cahill, G.F., Jr., Herrera, M.G., Morgan, A.P., Soeldner, J.S., Steinke, J., Levy, P.L., Reichard, G.A., Jr., and Kipnis, D.M. (1966). Hormone-fuel interrelationships during fasting. *The Journal of clinical investigation* 45, 1751-1769.

Cardoso, M.L., Rodrigues, M.R., Leao, E., Martins, E., Diogo, L., Rodrigues, E., Garcia, P., Rolland, M.O., and Vilarinho, L. (2004). The E37X is a common HMGCL mutation in Portuguese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric CoA lyase deficiency. *Molecular genetics and metabolism* 82, 334-338.

Chen, T.Y., Smith, W., Rosenstock, J.L., and Lessnau, K.D. (2006). A life-threatening complication of Atkins diet. *Lancet* 367, 958.

- Cox, K.B., Hamm, D.A., Millington, D.S., Matern, D., Vockley, J., Rinaldo, P., Pinkert, C.A., Rhead, W.J., Lindsey, J.R., and Wood, P.A. (2001). Gestational, pathologic and biochemical differences between very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the mouse. *Human molecular genetics* 10, 2069-2077.
- Dodson, W.E., Prensky, A.L., DeVivo, D.C., Goldring, S., and Dodge, P.R. (1976). Management of seizure disorders: selected aspects. Part II. *The Journal of pediatrics* 89, 695-703.
- Falk, R.E., Cederbaum, S.D., Blass, J.P., Gibson, G.E., Kark, R.A., and Carrel, R.E. (1976). Ketonic diet in the management of pyruvate dehydrogenase deficiency. *Pediatrics* 58, 713-721.
- Faull, K., Bolton, P., Halpern, B., Hammond, J., Danks, D.M., Hahnel, R., Wilkinson, S.P., Wysocki, S.J., and Masters, P.L. (1976). Letter: Patient with defect in leucine metabolism. *The New England journal of medicine* 294, 1013.
- Fenselau, A., and Wallis, K. (1974). Ketone body usage by mammals. Acetoacetate substrate inhibition of CoA transferase from various rat tissues. *Life sciences* 15, 811-818.
- Forouhar, F., Hussain, M., Farid, R., Benach, J., Abashidze, M., Edstrom, W.C., Vorobiev, S.M., Xiao, R., Acton, T.B., Fu, Z., Kim, J.J., Miziorko, H.M., Montelione, G.T., and Hunt, J.F. (2006). Crystal structures of two bacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyases suggest a common catalytic mechanism among a family of TIM barrel metalloenzymes cleaving carbon-carbon bonds. *The Journal of biological chemistry* 281, 7533-7545.
- Fortier, M., Wang, S.P., Mauriege, P., Semache, M., Mfuma, L., Li, H., Levy, E., Richard, D., and Mitchell, G.A. (2004). Hormone-sensitive lipase-independent adipocyte lipolysis during beta-adrenergic stimulation, fasting, and dietary fat loading. *American journal of physiology* 287, E282-288.
- Frischmeyer, P.A., and Dietz, H.C. (1999). Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Human molecular genetics* 8, 1893-1900.
- Fukao, T., Lopaschuk, G.D., and Mitchell, G.A. (2004). Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 70, 243-251.
- Fukao, T., Mitchell, G.A., Song, X.Q., Nakamura, H., Kassovska-Bratinova, S., Orii, K.E., Wraith, J.E., Besley, G., Wanders, R.J., Niezen-Koning, K.E., Berry, G.T., Palmieri, M., and Kondo, N. (2000). Succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT): cloning of the human SCOT gene, tertiary structural modeling of the human SCOT monomer, and characterization of three pathogenic mutations. *Genomics* 68, 144-151.

Gibson, K.M., Cassidy, S.B., Seaver, L.H., Wanders, R.J., Kennaway, N.G., Mitchell, G.A., and Spark, R.P. (1994). Fatal cardiomyopathy associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *Journal of inherited metabolic disease* 17, 291-294.

Gualdi, R., Bossard, P., Zheng, M., Hamada, Y., Coleman, J.R., and Zaret, K.S. (1996). Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes & development* 10, 1670-1682.

Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., Kratky, D., Wagner, E.F., Klingenspor, M., Hoefler, G., and Zechner, R. (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312, 734-737.

Hayflick, S.J., Westaway, S.K., Levinson, B., Zhou, B., Johnson, M.A., Ching, K.H., and Gitschier, J. (2003). Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden-Spatz syndrome. *The New England journal of medicine* 348, 33-40.

Huttenlocher, P.R. (1976). Ketonemia and seizures: metabolic and anticonvulsant effects of two ketogenic diets in childhood epilepsy. *Pediatric research* 10, 536-540.

Ibdah, J.A., Perlegas, P., Zhao, Y., Angdisen, J., Borgerink, H., Shadoan, M.K., Wagner, J.D., Matern, D., Rinaldo, P., and Cline, J.M. (2005). Mice heterozygous for a defect in mitochondrial trifunctional protein develop hepatic steatosis and insulin resistance. *Gastroenterology* 128, 1381-1390.

Johnson, M.A., Kuo, Y.M., Westaway, S.K., Parker, S.M., Ching, K.H., Gitschier, J., and Hayflick, S.J. (2004). Mitochondrial localization of human PANK2 and hypotheses of secondary iron accumulation in pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1012, 282-298.

Jones, K.J., Wilcken, B., and Kilham, H. (1997). The long-term evolution of a case of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency associated with deafness and retinitis pigmentosa. *Journal of inherited metabolic disease* 20, 833-834.

Kalderon, B., Sheena, V., Shachrur, S., Hertz, R., and Bar-Tana, J. (2002). Modulation by nutrients and drugs of liver acyl-CoAs analyzed by mass spectrometry. *Journal of lipid research* 43, 1125-1132.

Kelleher, J.K., and Bryan, B.M., 3rd (1985). A $^{14}\text{CO}_2$ ratios method for detecting pyruvate carboxylation. *Analytical biochemistry* 151, 55-62.

Koeller, D.M., Sauer, S., Wajner, M., de Mello, C.F., Goodman, S.I., Woontner, M., Muhlhausen, C., Okun, J.G., and Kolker, S. (2004). Animal models for glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of inherited metabolic disease* 27, 813-818.

Kotzbauer, P.T., Truax, A.C., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2005). Altered neuronal mitochondrial coenzyme A synthesis in neurodegeneration with brain iron accumulation caused by abnormal processing, stability, and catalytic activity of mutant pantothenate kinase 2. *J Neurosci* 25, 689-698.

Kurtz, D.M., Rinaldo, P., Rhead, W.J., Tian, L., Millington, D.S., Vockley, J., Hamm, D.A., Brix, A.E., Lindsey, J.R., Pinkert, C.A., O'Brien, W.E., and Wood, P.A. (1998). Targeted disruption of mouse long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene reveals crucial roles for fatty acid oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15592-15597.

Lahjouji, K., Mitchell, G.A., and Qureshi, I.A. (2001). Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency. *Molecular genetics and metabolism* 73, 287-297.

Marliss, E.B., Murray, F.T., and Nakhooda, A.F. (1978). The metabolic response to hypocaloric protein diets in obese man. *The Journal of clinical investigation* 62, 468-479.

Minkler, P.E., Kerner, J., Kasumov, T., Parland, W., and Hoppel, C.L. (2006). Quantification of malonyl-coenzyme A in tissue specimens by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 352, 24-32.

Mitchell, G.A., Fukao, T. (2001). Inborn errors of ketone body metabolism. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. C.S. Scriver, Beaudet, A., Sly, W., Valle, D., ed. (New York: McGraw Hill), pp. 2327 - 2356.

Mitchell, G.A., Kassovska-Bratinova, S., Boukaftane, Y., Robert, M.F., Wang, S.P., Ashmarina, L., Lambert, M., Lapierre, P., and Potier, E. (1995). Medical aspects of ketone body metabolism. *Clinical and investigative medicine* 18, 193-216.

Mitchell, G.A., Ozand, P.T., Robert, M.F., Ashmarina, L., Roberts, J., Gibson, K.M., Wanders, R.J., Wang, S., Chevalier, I., Plochl, E., and Mizioro, H. (1998). HMG CoA lyase deficiency: identification of five causal point mutations in codons 41 and 42, including a frequent Saudi Arabian mutation, R41Q. *American journal of human genetics* 62, 295-300.

Mitchell, G.A., Robert, M.F., Hruz, P.W., Wang, S., Fontaine, G., Behnke, C.E., Mende-Mueller, L.M., Schappert, K., Lee, C., Gibson, K.M., and et al. (1993). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL). Cloning of human and chicken liver HL cDNAs and characterization of a mutation causing human HL deficiency. *The Journal of biological chemistry* 268, 4376-4381.

Miyazaki, T., Ohura, T., Kobayashi, M., Shigematsu, Y., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Hata, I., Aoki, Y., Yang, X., Minjares, C., Haruta, I., Uto, H., Ito, Y., and Muller, U. (2001). Fatal propionic acidemia in mice lacking propionyl-CoA carboxylase and its

rescue by postnatal, liver-specific supplementation via a transgene. *The Journal of biological chemistry* 276, 35995-35999.

Nyman, L.R., Cox, K.B., Hoppel, C.L., Kerner, J., Barnoski, B.L., Hamm, D.A., Tian, L., Schoeb, T.R., and Wood, P.A. (2005). Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1a (liver isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Molecular genetics and metabolism* 86, 179-187.

Oliveira, C.P., Coelho, A.M., Barbeiro, H.V., Lima, V.M., Soriano, F., Ribeiro, C., Molan, N.A., Alves, V.A., Souza, H.P., Machado, M.C., and Carrilho, F.J. (2006). Liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of experimental nonalcoholic fatty liver disease. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ...* [et al 39, 189-194.

Owen, O.E., Felig, P., Morgan, A.P., Wahren, J., and Cahill, G.F., Jr. (1969). Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *The Journal of clinical investigation* 48, 574-583.

Owen, O.E., Morgan, A.P., Kemp, H.G., Sullivan, J.M., Herrera, M.G., and Cahill, G.F., Jr. (1967). Brain metabolism during fasting. *The Journal of clinical investigation* 46, 1589-1595.

Owen, O.E., Reichard, G.A., Jr., Boden, G., and Shuman, C. (1974). Comparative measurements of glucose, beta-hydroxybutyrate, acetoacetate, and insulin in blood and cerebrospinal fluid during starvation. *Metabolism: clinical and experimental* 23, 7-14.

Peters, H., Nefedov, M., Sarsero, J., Pitt, J., Fowler, K.J., Gazeas, S., Kahler, S.G., and Ioannou, P.A. (2003). A knock-out mouse model for methylmalonic aciduria resulting in neonatal lethality. *The Journal of biological chemistry* 278, 52909-52913.

Roe, C.R., Millington, D.S., Maltby, D.A., Kahler, S.G., and Bohan, T.P. (1984). L-carnitine therapy in isovaleric acidemia. *The Journal of clinical investigation* 74, 2290-2295.

Seglen, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in cell biology* 13, 29-83.

Serra, D., Casals, N., Asins, G., Royo, T., Ciudad, C.J., and Hegardt, F.G. (1993). Regulation of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase protein by starvation, fat feeding, and diabetes. *Archives of biochemistry and biophysics* 307, 40-45.

Soni, K.G., Lehner, R., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Semache, M., Gao, W., Ashman, K., Pshezhetsky, A.V., and Mitchell, G.A. (2004). Carboxylesterase 3 (EC 3.1.1.1) is a major adipocyte lipase. *The Journal of biological chemistry* 279, 40683-40689.

Stacey, T.E., de Sousa, C., Tracey, B.M., Whitelaw, A., Mistry, J., Timbrell, P., and Chalmers, R.A. (1985). Dizygotic twins with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria; unusual presentation, family studies and dietary management. *European journal of pediatrics* 144, 177-181.

Strzelecki, T., Thomas, J.A., Koch, C.D., and LaNoue, K.F. (1984). The effect of hormones on proton compartmentation in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 259, 4122-4129.

Sweetman, L., Williams, J.C. (2001). Branched Chain Organic Acidurias. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. C.S. Scriver, Beaudet, A., Sly, W., Valle, D., ed. (New York: McGraw Hill), pp. 2125 - 2163.

Swink, T.D., Vining, E.P., and Freeman, J.M. (1997). The ketogenic diet: 1997. *Advances in pediatrics* 44, 297-329.

Tahiliani, A.G. (1989). Dependence of mitochondrial coenzyme A uptake on the membrane electrical gradient. *The Journal of biological chemistry* 264, 18426-18432.

Tahiliani, A.G., and Beinlich, C.J. (1991). Pantothenic acid in health and disease. *Vitamins and hormones* 46, 165-228.

Tholen, H., and Mordhorst, R. (1976). Hepatic and cerebral coenzyme A contents after intravenous injection of coenzyme A in rats. *Experientia* 32, 830-832.

Tolwani, R.J., Hamm, D.A., Tian, L., Sharer, J.D., Vockley, J., Rinaldo, P., Matern, D., Schoeb, T.R., and Wood, P.A. (2005). Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in gene-targeted mice. *PLoS genetics* 1, e23.

Trounce, I.A., Kim, Y.L., Jun, A.S., and Wallace, D.C. (1996). Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. *Methods in enzymology* 264, 484-509.

Van Hove, J.L., Kahler, S.G., Millington, D.S., Roe, D.S., Chace, D.H., Heales, S.J., and Roe, C.R. (1994). Intravenous L-carnitine and acetyl-L-carnitine in medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency and isovaleric acidemia. *Pediatric research* 35, 96-101.

Wang, S.P., Laurin, N., Himms-Hagen, J., Rudnicki, M.A., Levy, E., Robert, M.F., Pan, L., Oligny, L., and Mitchell, G.A. (2001). The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obesity research* 9, 119-128.

Wang, S.P., Marth, J.D., Oligny, L.L., Vachon, M., Robert, M.F., Ashmarina, L., and Mitchell, G.A. (1998). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL): gene targeting causes prenatal lethality in HL-deficient mice. *Human molecular genetics* 7, 2057-2062.

Wang, S.P., Robert, M.F., Gibson, K.M., Wanders, R.J., and Mitchell, G.A. (1996). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL): mouse and human HL gene (HMGCL) cloning and detection of large gene deletions in two unrelated HL-deficient patients. *Genomics* 33, 99-104.

Williamson, D.H., Bates, M.W., and Krebs, H.A. (1968). Activity and intracellular distribution of enzymes of ketone-body metabolism in rat liver. *The Biochemical journal* 108, 353-361.

Wilson, W.G., Cass, M.B., Sovik, O., Gibson, K.M., and Sweetman, L. (1984). A child with acute pancreatitis and recurrent hypoglycemia due to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *European journal of pediatrics* 142, 289-291.

Wohlhueter, R.M., and Harper, A.E. (1970). Coinduction of rat liver branched chain alpha-keto acid dehydrogenase activities. *The Journal of biological chemistry* 245, 2391-2401.

Woldegiorgis, G., Spennetta, T., Corkey, B.E., Williamson, J.R., and Shrago, E. (1985). Extraction of tissue long-chain acyl-CoA esters and measurement by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry* 150, 8-12.

